

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Facultad de Ingeniería**

**Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos**



**Reducción de microorganismos causales de enfermedades transmitidas por alimentos en retoños de alfalfa (*Medicago sativa*) y soya (*Phaseolus aureus*) por medio de la utilización de bacterias ácido lácticas**

Trabajo de graduación presentado por  
Víctor Hugo Jiménez Pérez  
para optar al grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Guatemala  
2004

**Reducción de microorganismos causales de enfermedades transmitidas por alimentos en retoños de alfalfa (*Medicago sativa*) y soya (*Phaseolus aureus*) por medio de la utilización de bacterias ácido lácticas**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Facultad de Ingeniería**

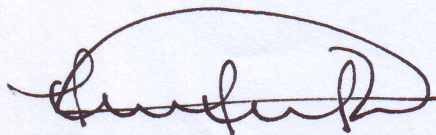
**Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos**



**Reducción de microorganismos causales de enfermedades transmitidas por alimentos en retoños de alfalfa (*Medicago sativa*) y soya (*Phaseolus aureus*) por medio de la utilización de bacterias ácido lácticas**

Guatemala  
2004

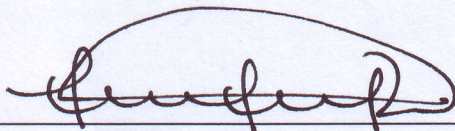
VoBo.



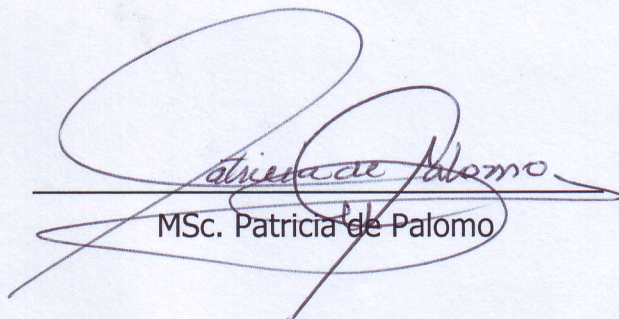
Dr. Fernando Maul

Asesor

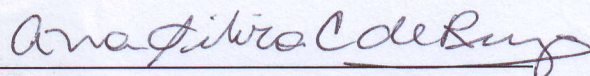
Tribunal Examinador:



Dr. Fernando Maul



MSc. Patricia de Palomo



MSc. Ana Silvia Colmenares

Fecha de aprobación. Guatemala, 29 de Noviembre de 2004

## DEDICATORIA

A Jesucristo mi Señor de quien proviene toda sabiduría e inteligencia

A Noemi, fuente de inspiración y apoyo en mi vida

A mis hijos José Víctor y Andrea María, por ser el regalo de Dios para mí

A mis padres Cesar y Magaly de Jiménez, por invertir en mí no sólo su tiempo y amor, sino que sus vidas y lo mejor de ellos

A mi hermano Cesar Augusto y su familia, Claudia, Lissel y Dara por ser tan especiales

A mi familia política Armando y Julia, Ana Lucía y Leo, por agregar tanto valor a mi vida

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a la Universidad del Valle en especial a las Licenciadas Patricia de Palomo y Ana Silvia Colmenares de Ruiz por la oportunidad de completar este escalón en la escalera de mi vida.

Al Dr. Fernando Maul, quien me ha ayudado enormemente a realizar el presente proyecto. A la Licenciada Teresita Aguilar de Miranda por su invaluable amistad y apoyo en todo tiempo.

Al Laboratorio Nacional de Salud en especial a los compañeros del Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Licda. Leyla Dabroy, Sr. Edelman Gonzalez y Licda. Maribel Robledo y Sra. Maribel Saquic.

A los doctores Thomas Montville, Ulrich Schillinger, Lars Axelsson, Robert Klaenhaemmer, Colin Hill, Jean-Christophe Piard y a la Licenciada Florencia Moguel por su invaluable apoyo al proporcionarme cepas de LAB

A todos mis hermanos en la fe y amigos. Gracias

## ÍNDICE

Lista de tablas .....	viii
Lista de gráficas .....	ix
Resumen .....	x
I. Introducción .....	1
II. Antecedentes .....	2
a. Generalidades de la alfalfa y la soya .....	2
1. Propiedades nutricionales de la alfalfa.....	3
2. Propiedades medicinales de la alfalfa .....	5
3. Proceso de germinación y retoño .....	5
4. Flora microbiológica de los retoños .....	7
b. Microorganismos patógenos aislados de retoños .....	8
1. Brotes de <i>Salmonella</i> asociados a retoños.....	8
2. Brotes de <i>Escherichia coli</i> 0157:H7 asociados a retoños.....	10
3. Brotes de <i>Listeria monocytogenes</i> asociados a retoños .....	11
c. Desinfección química.....	11
d. Desinfección por medio de bacteriocinas .....	13
1. Método de dilución crítica .....	14
2. Método del recuento de sobrevivientes .....	14
3. Método de zona de difusión. ....	14
4. Método de recuento de Lacuna .....	15
III. JUSTIFICACIONES .....	17
IV. OBJETIVOS .....	18
a. Generales .....	18
b. Específicos .....	18
V. HIPÓTESIS .....	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
a. Universo .....	20
b. Medios .....	20
c. Metodología .....	22

1. Cepas de microorganismos .....	22
2. Semillas .....	22
3. Preparación de los Inóculos de los Patógenos .....	22
4. Contaminación de las semillas con los diversos patógenos.....	22
5. Preparación del cultivo de bacterias ácido lácticas .....	23
6. Determinación de la actividad bacteriogénica .....	24
7. Tratamiento con cloro de las semillas inoculadas con los patógenos.....	25
8. Análisis microbiológico de las semillas .....	25
9. Efecto de los tratamientos en las semillas. ....	26
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	27
VIII. PROGRAMACIÓN.....	29
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	30
X. CONCLUSIONES .....	42
XI. RECOMENDACIONES .....	43
XII. BIBLIOGRAFÍA .....	44
XIII. ANEXOS .....	49

## LISTA DE TABLAS

Tabla No. 1. Propiedades nutricionales del retoño del alfalfa crudo.....	3
Tabla No. 2. Carga microbiológica de semilla y retoño de alfalfa .....	7
Tabla No. 3. Radio de Inhibición de <i>Salmonella</i> por medio de la prueba de difusión.....	51
Tabla No. 4. Radio de inhibición de <i>Salmonella</i> por medio de Spot Test.....	51
Tabla No. 5. Radio de inhibición de <i>Escherichia coli</i> 0157:H7 por medio de la prueba de difusión.....	52
Tabla No. 6. Radio de inhibición de <i>Escherichia coli</i> 0157:H7 por medio de Spot Test.....	52
Tabla No. 7. Radio de inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> por medio de la prueba de difusión.....	53
Tabla No. 8. Radio de inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> por medio de Spot Test.....	53
Tabla No. 9. Cepas seleccionadas para inhibir a cada patógeno en particular.....	54
Tabla No. 10. Concentración de patógenos en los inóculos y recuento de los mismos en las semillas de Alfalfa y Soya.....	55
Tabla No. 11. Análisis de variancia de los tratamientos específicos para cada cepa de patógeno.....	56
Tabla No. 12. Porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa y soya contaminadas con <i>Salmonella</i> sp. después de sus respectivos tratamientos.....	57
Tabla No. 13. Porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa y soya contaminadas con <i>Escherichia coli</i> 0157:H7 después de sus respectivos tratamientos	58
Tabla No. 14. Porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa y soya contaminadas con <i>Listeria monocytogenes</i> después de sus respectivos tratamientos	59

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica No. 1. Anatomía interna de la semilla de alfalfa.....	6
Gráfica No. 2. Procesos metabólicos en la germinación.....	7
Gráfica No. 3. Inhibición de <i>Salmonella arizonae</i> ATCC 13046 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de alfalfa y soya .....	33
Gráfica No. 4. Inhibición de <i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de alfalfa y soya.....	34
Gráfica No.5. Inhibición de <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de alfalfa y soya.....	35
Gráfica No. 6. Inhibición de Escherichia coli 0157:H7 ATCC 35150 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de alfalfa y soya.....	36
Grafica No. 7. Inhibición de Escherichia coli 0157:H7 ATCC 700728 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de alfalfa y soya.....	37
Grafica No.8. Inhibición de Escherichia coli 0157:H7 ECO por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de alfalfa y soya .....	37
Grafica No.9. Inhibición de Listeria monocytogenes ATCC 19115 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de alfalfa y soya.....	38
Grafica No.10. Inhibición de Listeria monocytogenes ATCC 984 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de alfalfa y soya .....	39
Gráfica No. 11. Marcha analítica.....	49

## Resumen

Debido al creciente consumo de los retoños y su implicación en diversos brotes de ETA's a escala mundial con miles de casos positivos a diferentes patógenos, se puede avizorar que el camino es largo aún para obtener retoños completamente inocuos.

La producción de retoños conlleva diversos pasos, desde el tratamiento y manejo adecuado de la semilla hasta la cosecha y distribución del producto a la mesa del consumidor. Las medidas sanitarias que la FDA y otras agencias han recomendado para el cultivo y consumo de retoños de alfalfa han ayudado a reducir epidemias mayores, pero se requieren mayores esfuerzos para asegurar buenas prácticas en:

- Control de la contaminación de la semilla
- Transporte y almacenamiento de la semilla
- Distribución de la semilla
- Control sanitario del equipo utilizado en el cultivo de retoños
- Medidas higiénicas del personal involucrado en el proceso de cultivo
- Identificación y registro de lotes de semillas y retoños
- Implantación de HACCP en las plantas de cultivo

El método más efectivo para la reducción de patógenos de la semilla es la inmersión en una solución de cloro activo a una concentración de 20,000 ppm. Esta reducción es parcial. lo cual hace necesario investigar nuevos métodos o combinaciones de los mismos para alcanzar un nivel de carga bacteriana lo más aceptable posible.

Mientras no se asegure completamente la inocuidad de los retoños la FDA ha generado una advertencia sugiriendo que los ancianos, niños y personas inmunocomprometidas eviten totalmente el consumo de retoños crudos. <sup>(16,17)</sup>.

La frecuencia del uso de BAL y sus metabolitos en alimentos crudos y procesados, se encuentra en una espiral de aumento tanto en etapas pre-proceso como post- proceso y debido a la naturaleza de su mecanismos de acción (antagonismo específico contra cepas bacterianas) y a las características de crecimiento de las cepas productoras (procesos fermentativos con condiciones

comúnmente utilizados en la industria), constituyen una alternativa viable y con gran potencial para la obtención de alimentos inocuos.

## I. INTRODUCCIÓN

La asociación entre microorganismos patógenos y vegetales frescos ha sido objeto de un estudio más profundo en las últimas décadas y constituye un riesgo potencial de infección al consumidor <sup>(1,2,3,4)</sup>.

Esto ha sido reportado por numerosas agencias y organizaciones relacionadas con la protección al consumidor indicando que la prevalencia de casos de infecciones debidas a *Salmonella* sp. aumentó un 20.32 %, desde 12.3 hasta 14.8 por cada 100,000 habitantes. Asimismo las infecciones causadas por *Escherichia coli* 0157:H7 han sido reportadas como emergentes, presentándose en productos como el jugo de naranja hasta los retoños de semillas<sup>(4)</sup>.

La producción de retoños, a diferencia de la mayoría de frutas y verduras, se lleva a cabo en condiciones ambientales que favorecen la multiplicación y diseminación de microorganismos patógenos. Estos productos han sido implicados en una serie de brotes de ETA's debidos a *Salmonella* sp y *Escherichia coli* 0157:H7 y la evidencia sugiere que en la mayoría de los brotes la semilla ha sido un factor importante en la carga microbiológica del producto <sup>(4)</sup>.

Es por ello que es el propósito de este estudio comparar la eficacia de la desinfección química contra el tratamiento de semilla con cepas de bacterias ácido lácticas, para obtener una semilla de alfalfa y soya con una carga microbiológica tal que no represente algún peligro al consumidor

## II. ANTECEDENTES

### A. GENERALIDADES DE LA ALFALFA Y SOYA

La alfalfa (*Medicago sativa*) recibe diversos nombres de uso popular tales como grama de búfalo, hierba de búfalo, trébol chileno, trébol español, trébol de California, padre de todas las plantas, reina de los forrajes, etc., y ha sido apreciada durante siglos por su alto contenido nutricional. Se sabe que ya era cultivada por los persas y el imperio romano describió su uso alrededor de 490 B.C.. Fue traída hacia Norte América por los colonos alrededor del año 1700. Existen variedades de la especie alrededor del mundo como la *Medicagopolymorpha* y otras, pero *M. sativa* es la más conocida por sus diversas características y propiedades nutricionales <sup>(20,56,3)</sup>

La "reina de los forrajes" es el cuarto cultivo de mayor distribución en los Estados Unidos, después del maíz, trigo y soya y duplica la extensión en acres al algodón. A pesar de que no hay valores publicados acerca del forraje se estima que su producción anual es de 8.1 billones de dólares <sup>(1)</sup>. Además, existen 23.6 millones de acres de alfalfa para cosechar el forraje con un promedio de 3.35 toneladas por acre, representando el forraje \$ 102.5 por tonelada. Las exportaciones de alimentos conteniendo alfalfa hacia otras naciones representan a la economía de los Estados Unidos la cantidad de 49.4 millones de dólares <sup>(20)</sup>.

La semilla de alfalfa se siembra principalmente en el noroeste de la unión americana, siendo los estados de California, Idaho, Nevada, Oregon, Washington y Wyoming los lugares de mayor producción. El rendimiento aproximado en 1999 fue de 115 millones de libras, con un precio promedio de \$ 190 por quintal de semilla <sup>(20)</sup>.

La importancia de la alfalfa radica no sólo en su producción, sino en su participación en la producción de miel de abejas, en la producción de biomasa, su alta capacidad de adaptación y su papel como fuente importante para la fijación de nitrógeno. Por ejemplo, un acre promedio de alfalfa fijará alrededor de 200 kg de nitrógeno al año, reduciendo así la necesidad de aplicar fertilizantes nitrogenados de alto valor monetario <sup>(20)</sup>.

Además de todas las aplicaciones de la alfalfa anteriormente descritas, se puede mencionar su utilización en la producción de electricidad, bioremedio de suelos y como fuente de la producción industrial de enzimas tales como peroxidasa de lignina, alfa amilasa, celulasa y fitasa. <sup>(20)</sup>

La alfalfa es utilizada primordialmente en la alimentación de vacas, caballos y ovejas, pero también es utilizada en pollos, pavos y otros animales de granja, por lo tanto, tiene gran importancia en la producción de carne, leche y otros productos de origen animal. La producción de retoños de alfalfa dedicada al consumo humano ha alcanzado una producción anual aproximada de 300,000 toneladas con un valor de 250 millones de dólares En Guatemala se reportan ventas de supermercado de retoños de alfalfa de 400 libras anuales. <sup>(20,42)</sup>.

## 1. Propiedades nutricionales de la alfalfa

El retoño de alfalfa pertenece a un grupo de "retoños", los cuales han sido catalogados como alimentos nutricionalmente completos. Esto se debe principalmente al hecho que de toda la amplia gama de nutrientes que se encuentran en la semilla, algunos compuestos aumentan hasta un 500 % después de retoñar y aparentemente continúan aumentando en algunos retoños después de cosecharlos y refrigerarlos <sup>(3)</sup>.

Los retoños también poseen la característica de proveer de proteína cruda así como de una fuente excelente de vitaminas y minerales. Específicamente, la alfalfa contiene vitamina A, D, E, C, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantoténico, inositol, biotina y ácido fólico. Además, contiene fósforo, calcio, potasio, sodio, cloruro, azufre, magnesio, cobre, manganeso, hierro, cobalto, boro y trazas de molibdeno, níquel, plomo, estroncio y paladio, entre otros<sup>(20,56,3,52)</sup>. (ver Tabla No. 1)

Tabla No.1 Propiedades nutricionales del retoño de alfalfa crudo (53)

<b>Nutriente</b>	<b>Unidad</b>	<b>1 copa 33.0 gramos</b>
<b>Proximal</b>		
Agua	g	30.076
Energía	kcal	9.570
Energía	kj	39.930
Proteína	g	1.317
Grasa total	g	0.228
Carbohidratos (por diferencia)	g	1.247
Fibra dietética total	g	0.825
Ceniza	g	0.132
<b>Minerales</b>		
Calcio	mg	10.560
Hierro	mg	0.317
Magnesio	mg	8.910
Fósforo	mg	23.100
Potasio	mg	26.070
Sodio	mg	1.980
Zinc	mg	0.304
Cobre	mg	0.052
Manganeso	mg	0.062
Selenio	mcg	0.198
<b>Vitaminas</b>		
Acido ascórbico	mg	2.706
Tiamina	mg	0.025
Riboflavina	mg	0.042
Niacina	mg	0.159

Continuación TablaNo.1

AcidoPantoténico	mg	0.186
Vitamina B-6	mg	0.011
Acido fólico	mcg	11.880
Vitamina B 12	mcg	0.000
Vitamina A	UI	51.150
Vitamina E	mg	0.007
<b>Lípidos</b>		
Acidos grasos saturados	g	0.023
4:0	g	0.000
6:0	g	0.000
8:0	g	0.000
10:0	g	0.000
12:0	g	0.000
14:0	g	0.001
16:0	g	0.019
18:0	g	0.003
<b>Acidos grasos monoinsaturados</b>	g	0.018
16:1	g	0.000
18:1	g	0.018
20:1	g	0.000
22:1	g	0.000
<b>Acidos grasos poli-insaturados</b>	g	0.135
18:2	g	0.077
18:3	g	0.058
18:4	g	0.000
20:4	g	0.000
20:5	g	0.000
22:5	g	0.000
22:6	g	0.000
Colesterol	mg	0.000
<b>Aminoácidos</b>		
Treonina	g	0.044
Isoleucina	g	0.047
Leucina	g	0.088
Lisina	g	0.071
Valina	g	0.048

## 2. Propiedades medicinales de la alfalfa

La alfalfa ha sido catalogada por los naturistas y la medicina alternativa como una ayuda para diversos padecimientos. Se le ha atribuido la capacidad de eliminar agua retenida del cuerpo, contribuyendo en padecimientos renales y urinarios así como también en procesos de adicción al alcohol y tabaco<sup>(56,3)</sup>. También se ha mencionado su utilidad en la reconstrucción celular, producción de leche materna, estabilidad hormonal, desintoxicación sanguínea, disminución de los niveles de colesterol. La medicina alternativa la utiliza entre otros para los tratamientos de anemia, gota, fatiga, insomnio, ulcera péptica, problemas pituitarios, estimulación del apetito y regulación de la diabetes. La cultura china, por siglos la ha utilizado en el tratamiento de cálculos renales<sup>(56,3)</sup>.

Por su alto contenido de clorofila, la alfalfa también ha sido catalogada como un alimento con propiedades anticancerígenas y antioxidantes. Asimismo, se ha reportado que posee además de la clorofila, un grupo de 400 pigmentos que fortalecen el sistema inmune para sobreponerse a reacciones de oxidación violentas<sup>(3)</sup>.

Existen 4 isoflavonas en la alfalfa que producen una respuesta estrogénica en animales y humanos, la cual puede alterar el ciclo menstrual cuando se consume en grandes cantidades, especialmente cuando se consume toda la planta. Esta respuesta la convierte en una posible opción para ayudar en problemas pre-menstruales y menopausia<sup>(56)</sup>.

Un problema ya conocido en la ingesta de alfalfa lo constituye que la misma en cualquiera de sus presentaciones, puede causar crisis en aquellos que sufren de lupus o artritis reumatoidea, por lo cual algunos autores aconsejan evitar comer la misma si se sufre de cualquiera de estos padecimientos. La razón aparente de esto es que el retoño de alfalfa contiene en altas concentraciones de un alcaloide denominado conavanina, el cual es sindicado de empeorar los síntomas de estas enfermedades auto-inmunes<sup>(56,3,52,7,8,4)</sup>.

## 3. Proceso de germinación y retoño

Las semillas de retoños contienen en su estructura interna básicamente un embrión, tejido de almacenamiento y una cubierta protectora. Una semilla viable, en presencia de agua y aire contiene en sí misma, todos los nutrientes necesarios para su crecimiento en 4 a 10 días. La semilla está compuesta por una capa de células bajo la cutícula, la cual impermeabiliza al embrión. Una pequeña rajadura en esta capa es la que contribuye a la absorción de agua. Asimismo existe otro punto frágil en esta capa cerca del cotiledón denominado "el lente". En algunas especies, el lente se encuentra bloqueado por una sustancia denominada el "tapón" estrofoliar<sup>(21,22)</sup>. Ver Figura 1

La germinación se lleva a cabo dentro de un rango de temperatura relativamente estrecho. Además de una gran cantidad de agua necesaria para germinar, también se requiere de un intercambio de gases intenso. Dependiendo del tipo de semilla, la tasa de respiración puede alcanzar su punto máximo en un lapso de pocas horas o bien puede continuar durante los días subsiguientes después del embebido del agua<sup>(22)</sup>.

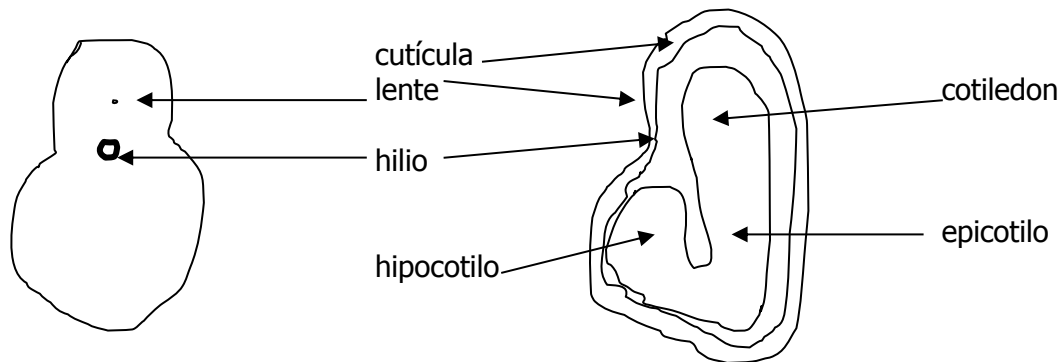


Figura 1. Anatomía interna de la semilla de alfalfa <sup>(10)</sup>

Durante la primera fase de germinación, la entrada inicial de agua o embebido, ocasiona que la semilla se hinche. Cuando las semillas secas son expuestas al agua, un flujo rápido ingresa el cual es regulado por la permeabilidad de la cubierta de la semilla o cutícula. Al mismo tiempo, el bióxido de carbono presente en los espacios intercelulares, sale de la semilla. El agua embebida es absorbida por las proteínas, las cuales atraen moléculas polares. Las semillas de alfalfa se almacenan en condiciones de baja humedad y las membranas celulares cercanas a la cutícula son más frágiles, por lo que permiten la salida de nutrientes hacia el entorno exterior que las rodea, ocasionando una leve pérdida de nutrientes. La permeabilidad se va regulando a medida que las semillas se hinchan <sup>(22,23)</sup>.

Después del embebido, el ácido gliberélico activa el ADN de las células del aleurona, las cuales producen la enzima amilasa. La amilasa es transportada hacia el endosperma, donde son metabolizados los ácidos grasos de reserva y el almidón, transformándolos en carbohidratos. Estos últimos son transportados hacia el embrión donde son utilizados para la germinación. Cuando el radículo sale y rompe la cutícula de la semilla, se considera la germinación como completa, formándose primero la raíz y posteriormente se desarrolla el tallo <sup>(11)</sup>. Ver Figura 2

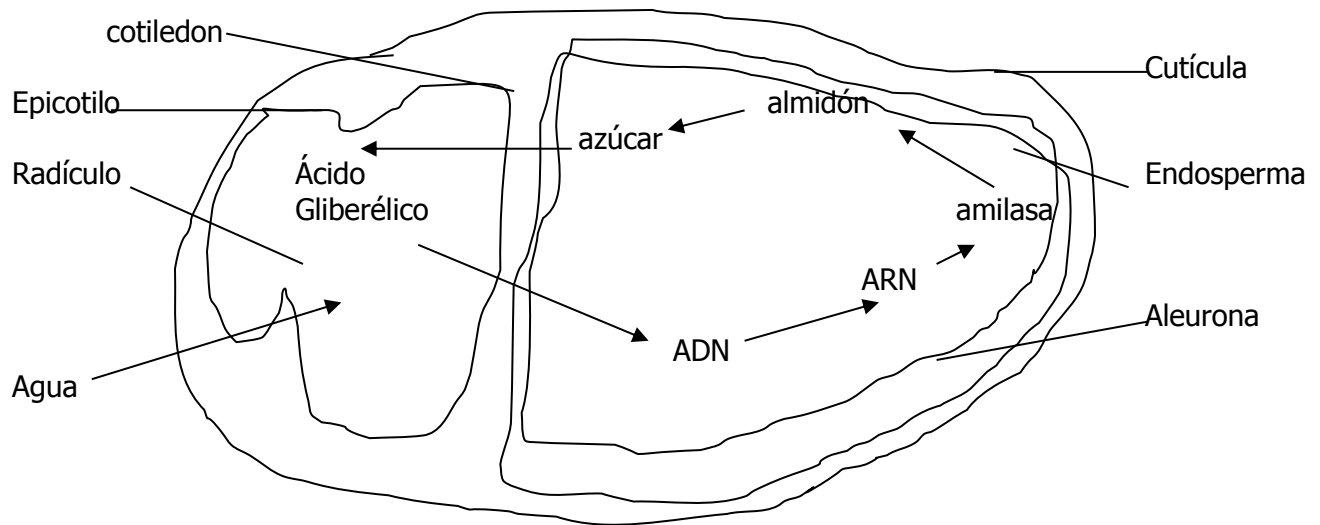


Figura 2. Procesos metabólicos en la germinación <sup>(11)</sup>

Se considera una tasa de productividad como saludable de 15:1 por libra sembrada y las condiciones de intercambio de aire y temperatura deben ser tales que aseguren un crecimiento adecuado. Se recomienda no elevar la temperatura del aire más allá de 30°C y mantener un flujo apropiado de aire en la cámara de crecimiento. Los retoños de alfalfa alcanzan su madurez hortícola alrededor de 6 a 8 días y se expone a luz artificial de 24 –48 horas previo a su cosecha, para alcanzar su concentración máxima de clorofila <sup>(24,25,26)</sup>.

#### 4. Flora Microbiológica de los Retoños

Análisis microbiológicos han demostrado que tanto semillas de alfalfa como de soya contienen rutinariamente una alta carga microbiológica ( $10^2 - 10^6$  UFC/ g), incluyendo coliformes totales ( $10^4$  UFC/ g) y coliformes fecales ( $10^2 - 10^3$  UFC/g), los cuales aparentemente son parte de la flora normal del producto <sup>(14,17)</sup>.

La humedad y características de los procesos de retoño proveen un medio adecuado para el crecimiento bacteriano, por lo cual la carga microbiológica de los retoños alcanza a menudo 2 o 3 unidades logarítmicas mayores que en las semillas <sup>(14)</sup>. Ver Tabla No. 2.

Tabla No.2. Carga microbiológica de semilla y retoño de alfalfa

	Semilla ( por gramo)			Retoño (por gramo)		
	Recuento total	Coliformes totales	Coliformes fecales	Recuento total	Coliformes totales	Coliformes fecales
UFC	$10^{3-6}$	$10^4$	$10^3$	$10^8$	$> 10^4$	$10^3$

se han identificado diversos factores que contribuyen al acelerado crecimiento bacteriano, entre los cuales se pueden mencionar:

- enzimáticos
- nutricionales
- ambientales

El frijol de soya y las semillas de alfalfa contienen altos niveles de inhibidores de tripsina, los cuales pueden proveer mecanismos de defensa por medio de los cuales las semillas inhiben las enzimas similares a tripsina en las bacterias. Los niveles de tripsina descienden durante la germinación, probablemente se deba a derrame en la superficie permitiendo a la microbiota proliferar. De la misma manera, los componentes nutricionales de las semillas (carbohidratos y aminoácidos) se encuentran a bajas concentraciones en la semilla, pero una vez ésta germina, multiplica su concentración, proveyendo substratos para crecimiento bacteriano y finalmente, los altos niveles de humedad requeridos y calor vital generado crean un medio de cultivo favorable para las bacterias <sup>(14)</sup>.

## B. Microorganismos Patógenos Aislados de Retoños

Se han aislado diversos microorganismos patógenos de retoños de alfalfa, soya, rábano, pero los agentes infecciosos sobre los cuales se ha depositado la mayor atención son *Salmonella* y *Escherichia coli* 0157:H7 <sup>(14,51,43,1,35,36,54,8,10,44,16,47,12,7)</sup>.

Históricamente, los retoños han sido implicados en un número de brotes causados por alimentos en todo el mundo. Uno de los primeros casos ocurrió en 1973 y fue causado por semillas importadas de Suiza que estaban contaminadas con *Bacillus cereus*. La semilla era una mezcla de semillas de soya de Uganda, Holanda y semillas de mostaza de Dinamarca. Los análisis bacteriológicos de las semillas demostraron que las mismas presentaban un recuento total de bacterias entre  $10^7$  y  $10^8$  UFC/g y que contenían también una gran cantidad de bacterias aeróbicas esporoformadoras. A pesar que no se estimó un recuento de *Bacillus cereus*, se estimó que dicho microorganismo se encontraba en niveles que oscilaban entre  $10^5$  y  $10^7$  UFC/g. La fuente de *Bacillus cereus* no fue determinada. En 1987, Harmon y colaboradores recobraron *B. cereus* del 57 % de semillas de alfalfa, soya y trigo vendidas comercialmente <sup>(14,51)</sup>.

### 1. Brotes de *Salmonella* asociados a retoños

En 1988, retoños de soya fueron implicados epidemiológicamente en un estudio de un brote de *Salmonella* Saint-Paul en Inglaterra. Además, se aisló *Salmonella* Virchow de muestras del mismo retoño y fueron asociadas a siete casos de infección. Los retoños fueron producidos a partir de semillas importadas principalmente de Australia y Tailandia <sup>(14,51,43,1)</sup>.

En 1989 se reportó un brote en Inglaterra y Gales asociado a semillas de mostaza cultivado a partir de semilla importada de Holanda. La *Salmonella* fue detectada en un muestreo rutinario pocos días antes de que el brote iniciara <sup>(14,51,35)</sup>.

En Finlandia se reportaron ocho brotes a partir de retoños desde 1980 hasta 1997. En 1994, dos grandes brotes fueron asociados a retoños de alfalfa (282 casos en Suecia y 210 casos en Finlandia). En ambos brotes se aisló *Salmonella* bovismorbificans y la semilla fue importada de Australia <sup>(14,51,36,54,8)</sup>.

En 1995, se reportó un brote internacional de mayores proporciones por *Salmonella* Stanley en Finlandia y 17 estados de la Unión Americana causado por retoños de alfalfa cultivados a partir de semilla contaminada. Los patrones electroforéticos de ADN de S. Stanley de los pacientes en Finlandia y los E.E.U.U. presentaron un patrón poco usual y una resistencia antibiótica diferente a las cepas provenientes del laboratorio cultivadas en casos no asociados a brotes. Las semillas que causaron los brotes fueron obtenidas del mismo distribuidor en Holanda, sugiriendo que las semillas fueron contaminadas en el mismo punto durante el crecimiento, cosecha o procesamiento <sup>(14, 51,10,44)</sup>.

A finales de 1995 y principios de 1996, brotes de salmonelosis en Dinamarca, Oregon y Columbia Británica en Canadá, fueron asociados al consumo de retoños de alfalfa contaminados con *Salmonella* Newport. Los pacientes de este brote multinacional comieron retoños de alfalfa cultivados de cuatro lotes diferentes de semilla de alfalfa. Las semillas implicadas fueron transportadas por la misma firma holandesa implicada en el brote de S. Stanley. Un estudio retrospectivo determinó un aumento de casos de S. Newport ocurridos en Dinamarca y varios estados de los E.E.U.U. durante el tiempo en que las semillas fueron cultivadas e ingeridas. El cultivo de las semillas implicadas reportó la presencia de S. Newport <sup>(14,51,35)</sup>.

En junio de 1996, se reportó el brote más grande hasta ahora reportado asociado a la ingestión de retoños en los E.E.U.U., localizado en California, resultando en un número mayor de 450 casos confirmados de infección con *Salmonella* Montevideo y *Salmonella* Meleagridis. La misma cepa de *Salmonella* Meleagridis fue aislada de pacientes, retoños en el supermercado y en las instalaciones de cultivo. La investigación en las instalaciones de cultivo de retoños reportó prácticas no sanitarias de cultivo y no higiénicas de los empleados <sup>(14,51,54,8)</sup>.

En junio de 1997 se reportó un brote de *Salmonella* Infantis y Anatum, que ocurrió desde febrero hasta junio de 1997 en Kansas y Missouri, el cual fue asociado a retoño de alfalfa producido por una industria local. El estudio epidemiológico, retrospectivo y de laboratorio reveló que la fuente de contaminación de *Salmonella* fue la semilla <sup>(14,51,36,10)</sup>.

En Octubre de 1997 en Alberta, Canadá se reportaron infecciones por S. Meleagridis asociadas al consumo de retoño de alfalfa y el serotipo fue aislado en la planta productora. Durante el mismo período casos de S. Meleagridis con el mismo tipo de fagos ocurrieron en personas que consumieron retoños de alfalfa provenientes de diferentes productores a lo largo de todo el país, pero estos lotes de producto fueron cultivados con el mismo lote de semilla que fue implicado en Alberta <sup>(14,51,43,54)</sup>.

En el norte de California, en 1997 y 1998 dos focos de infección de S. Seftenberg fueron asociados al consumo de retoños de alfalfa, pero no fue aislado de las semillas <sup>(14,51,35)</sup>.

En mayo de 1998, un foco de infección de *S. Havana* en pacientes de Arizona y California fue asociado al consumo de retoño de alfalfa. Un brote de *S. Cubana* ocurrió de mayo a septiembre de 1998 en Arizona, California y Nuevo México también asociado a retoños de alfalfa del mismo productor implicado en el brote de *S. Havana*. Los retoños de alfalfa ingeridos de ambos focos fueron cultivados del mismo lote de semilla y los cultivos de la semilla reportaron la presencia de *S. Havana*, *S. Cubana* y *S. Tennessee*<sup>(14,51,43,1,54)</sup>.

En los meses de Febrero a Marzo del año 2001, se reportaron 22 casos de infección de *Salmonella* asociados al consumo de retoño de alfalfa. En este reporte se implica a la compañía Fuji Natural Foods de Ontario California, la cual recogió de los anaqueles sus productos debido a la incriminación. Asimismo este productor tuvo que suspender el cultivo de retoños de alfalfa hasta que las inspecciones realizadas por agentes de salud del estado de Sacramento autorizaran reanudar sus labores (18). Al parecer este brote forma parte de un brote de varios estados que incluyen California, Colorado y Nuevo México con infecciones causadas por *Salmonella* Kottbus<sup>(14,51,1,44)</sup>.

En marzo del año 2000, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA)<sup>(7,30)</sup>, emitió una lista de productores cuyos retoños de alfalfa, debían ser retenidos y confiscados a raíz de un brote con *Salmonella* Muenchen a finales de 1999 entre los cuales se pueden mencionar:

- L. Stewart Company
- Pleasant Hill Grain Sprouting
- Joseph Company Ltd
- Spring Valley Gardens
- Sproutstation Inc
- Pennington Greens Alfalfa Sprouts

En el mes de mayo del año 2002 el director de servicios de salud de Berkeley en el estado de California, advirtió públicamente a la ciudadanía a no consumir retoño de soya crudo con nombre comercial Pacific Coast Sprout Farms con fecha de empaque previa al 18 de abril del mismo año, debido a la implicación de dichos retoños con 45 casos de *Salmonella enteritidis*. Este es el primer brote de *Salmonella* asociado a retoño de soya en los Estados Unidos, debido a que los anteriores se encuentran asociados a retoños de alfalfa y trébol.

## **2. Brotes de *Escherichia coli* 0157:H7 asociados a retoños**

De los brotes más relevantes de *Escherichia coli* 0157:H7, el brote asociado a retoños más grande hasta ahora reportado fue reportado en Japón en el año de 1996 con 10,000 casos de infección comprobada. En este brote el retoño de rábano fue el implicado, aunque el patógeno nunca fue aislado de las semillas. Un año después, también en Japón, el retoño de rábano también fue implicado en un nuevo brote infectando a 123 personas. En dicha oportunidad, el patógeno fue aislado de retoños abandonados en un refrigerador de una de las familias infectadas, sin embargo, a pesar de las investigaciones exhaustivas, no fue posible aislar la bacteria de la semilla con la cual fueron cultivados los retoños.<sup>(14,51,35,16)</sup>

En julio de 1997, se produjeron brotes simultáneos de *Escherichia coli* 0157:H7 en los estados de Michigan y Virginia epidemiológicamente asociados al consumo de retoño de alfalfa cultivados a partir del mismo lote de semilla indicando que la semilla fue la fuente de infección. <sup>(14,51,35,47,12,7)</sup>

### 3. Brotes de *Listeria monocytogenes* asociados a retoños

A pesar de que *Listeria monocytogenes* ha sido encontrada en retoños de alfalfa y soya, no existen reportes de brotes causados por este microorganismo por consumo de retoños. Esto se debe básicamente a que las manifestaciones clínicas de la transmisión de este microorganismo no son tan evidentes como lo son cuando se producen una infección intestinal <sup>(44-47)</sup>.

Los síntomas de una patología causada por *L. monocytogenes* son meningitis en grupos de riesgo, aborto espontáneo, y septicemia neonatal, entre otros. Por lo cual es difícil relacionar la ingestión de un determinado alimento con el apareamiento de síntomas o detección del hallazgo patológico<sup>(44)</sup>.

#### C. Desinfección Química

Se han realizado numerosos estudios para determinar la efectividad de una gran variedad de agentes químicos para matar y eliminar las bacterias patogénicas de los retoños y las semillas. Se ha evaluado tanto la eficacia de los químicos así como su concentración, temperatura y tiempo de exposición hacia la semilla. Ningún tratamiento por sí solo ha logrado reducir considerablemente la población de patógenos por más de 3 unidades logarítmicas <sup>(51,13,18,17,11,35)</sup>.

De estudios recientemente efectuados se puede obtener la siguiente información:

Holiday y col. <sup>(13)</sup> compararon la eficacia de diversos tratamientos químicos para eliminar *Salmonella* y *Escherichia coli* 0157:H7 de semillas descascaradas las cuales absorben mayor cantidad de agua, lo cual resulta en una germinación más rápida y uniforme durante la producción de retoños. Se asumió como hipótesis que la abrasión mecánica disminuye la eficacia de los tratamientos químicos utilizados para remover agentes patógenos de las semillas. Los agentes químicos utilizados fueron, cloro a 20,000 ppm., agua oxigenada 8%, hidróxido de calcio al 1%, hidróxido de calcio + Tween 80 utilizados para desinfectar semillas control y descascaradas las cuales fueron inoculadas con *Salmonella* y *Escherichia coli* 0157:H7 de dos diferentes proveedores de semillas. De los agentes químicos, el más eficaz resultó ser el hidróxido de calcio al 1%. Los resultados no indicaron suficiente evidencia que las semillas descascaradas fueran más fácilmente desinfectadas que las no descascaradas, por lo que se requieren más estudios de este fenómeno en particular.

Himathongkham y col. <sup>(18)</sup>, compararon la eficacia del amoníaco en las semillas de alfalfa, pues este producto es utilizado para desinfectar estiércol. Experimentalmente contaminaron semillas de alfalfa y soya con *Escherichia coli* 0157:H7 y *Salmonella hyphimurium* a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/g y fueron fumigadas con amoníaco a una concentración de

180 y 300 mg/litro de aire, producto de la reacción de sulfato de amonio e hidróxido de sodio. Las muestras fueron tomadas cada 22 horas. Los resultados de este estudio indican que se obtiene una reducción de la carga de patógenos entre 2 y 3 unidades logarítmicas en semillas de alfalfa contra 5 a 6 unidades logarítmicas de reducción en semilla de soya. Aparentemente se obtienen mejores resultados con cargas bacterianas menores. La germinación de estas semillas no fue alterada.

Gandhi y col.<sup>(17)</sup>, demostraron algunas observaciones realizadas por otros autores acerca de la migración de *Salmonella* hacia los tejidos interiores del retoño de alfalfa, utilizando una tecnología denominada microscopía confocal scan laser (LCSM). Ellos insertaron el gen de una proteína fluorescente en el cromosoma de una cepa de *Salmonella* Stanley e inocularon la semilla con esta cepa, a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/g por 5 min a 22 °C, luego dejaron retoñar la semilla. Las observaciones con epifluorescencia revelan la presencia de *Salmonella* en la superficie y la utilización de LCSM evidencia que *Salmonella* Stanley logra insertarse en los tejidos internos del tallo intacto del retoño durante la etapa de germinación. Se observó que la población de los retoños aumentó en 7 unidades logarítmicas en las primeras 24 horas de germinación y luego descendió 3 unidades logarítmicas durante 5 días de cultivo. Esto es de gran importancia pues demuestra el por qué del fracaso de los métodos químicos de desinfección los cuales no pueden ingresar al interior de las células vegetales.

Rajkowski y Thayer<sup>(4)</sup>, observaron una reducción bacteriana total de 5 unidades logarítmicas después de irradiar semillas y retoños de alfalfa con 2 kGy. Asimismo se observó que la vida media del producto fue aumentada en diez días en comparación con los retoños no irradiados. Los niveles de radiación en este estudio también fueron evaluados indicando que la dosis de 1 a 2 kGy es aceptable para la germinación de la semilla. Sería necesario combinar desinfección química acuosa con posterior irradiación para evaluar si se obtienen retoños más inocuos.

Demirci y col.<sup>(11)</sup>, demostraron que la aplicación de agua ozonificada y su posterior exposición a diversas temperaturas no reducen completamente la población de *Escherichia coli* 0157:H7 viable de semillas inoculadas con dicho patógeno.

Suslow y col.<sup>(48)</sup>, observaron una vez más que el tratamiento de la semilla de alfalfa con hipoclorito de calcio y su posterior exposición a altas temperaturas, no logran reducir la carga bacteriana de patógenos de manera que aseguren la inocuidad del producto.

## D. Desinfección Microbiológica por medio de Bacteriocinas

El estudio de las bacteriocinas se remonta hasta los reportes de Pasteur y Jobart, en los cuales probablemente se referían a las mismas. Dichos autores describen el efecto inhibitorio de bacterias comunes en la orina humana hacia *Bacillus anthracis*. No fue sino hasta el año 1925 en el que Gratia descubre un antibiótico producido por *Escherichia coli* el cual era activo contra otros miembros de la misma especie. Posteriormente se descubrieron sustancias similares en actividad que provenían del género Enterobacteriaceae por lo cual Gratia y Fredericq en el año 1946, les denominaron colicinas. En el año 1953, Jacob y colaboradores propusieron el término bacteriocinas debido a la amplia actividad anti – bacteriana que dichas sustancias presentaban, término que se sigue utilizando hasta el día de hoy. <sup>(34,50)</sup>

Las bacteriocinas son polipéptidos de bajo peso molecular simples o compuestos los cuales presentan actividad antibacteriana, antibiotica, fungicida, virucida y tumoricida y los genes que codifican su producción han sido reportados generalmente en ADN de plásmidos. Estos compuestos se han clasificado en base a su origen en cuatro distintas clases:

- Clase I, conocidas como lantibioticos debido a que contienen un anillo de lantionina en sus moléculas
- Clase II, pequeñas (< 10 Kdal), relativamente termo-estables y no contienen el anillo de lantionina. Estas se pueden subdividir en tres clases:
  - Clase II a, que son compuestos anti-Listeria con una secuencia N-terminal de Tyr- Gly- Asn- Gly- Val- X- Cys.
  - Clase II b, que forma complejos que afectan poros celulares
  - Clase II c, que son peptidos con anillo tiol que requieren residuos pobres en cisteina para activarse
- Clase III, que son compuestos relativamente grandes (> 30Kdal)
- Clase IV, que son proteínas complejas unidas a lípidos y carbohidratos <sup>(31,39)</sup>

Una de las bacteriocinas más extensamente estudiada es la nisina, la cual es un péptido de 3.5 KD conteniendo 57 aminoácidos, producida por *Lactococcus lactis*. Es la única bacteriocina denominada GRAS en los Estados Unidos y es utilizada como un biopreservante de alimentos a nivel mundial. También presenta la cualidad de actividad contra *Bacillus licheniformis*, *Clostridium sporogenes* PA3679 y *Clostridium botulinum*. El mecanismo de acción de la nisina promueve un aumento de la permeabilidad de las membranas celulares hacia iones y compuestos de bajo peso molecular. Asimismo, disipa el potencial de membrana y altera el diferencial de pH en los liposomas. <sup>(8,9,6)</sup>

Existe un gran número de bacteriocinas caracterizadas y purificadas, entre las cuales se pueden mencionar curvacina A, lactacina F, lactococcina A, B y M, leucocina A y UAL187, plantaricina A, pediocina PA-1 y Ach, sakacina A y 674, carnobacteriocina BMI y B2, acidocina A, helveticina J, quedando todavía muchos compuestos con actividad bacteriocida por conocer y caracterizar. <sup>(34,50,31,9,6,32,39,45,46,59,38,41,15,57,52,28,37,30,27,)</sup>

Los mecanismos de acción de las bacteriocinas incluyen:

- Inhibición de síntesis de peptidoglucanos
- Fijación a la pared celular bacteriana por medio de receptores específicos a nivel de membrana
- Activación de sistemas suicidas
- Supresión de formación de esporas
- Alteración del material nuclear
- Pérdida de ribosomas
- Impedimento de fijación bacteriana a tejido cárnico  
(34,50,32,15,57,52)

Los métodos para cuantificar o caracterizar la actividad de una bacteriocina son diversos debido a la variedad de modificaciones para comprobar antagonismo microbiológico y a la ausencia de estandarización en un campo relativamente poco conocido. <sup>(34,15)</sup>

Entre las metodologías más comúnmente se encuentran:

- a) Método de la dilución crítica
- b) Método del recuento de sobrevivientes
- c) Método de zona de difusión
- d) Método de recuento de Lacuna <sup>(34,15,58)</sup>

### **1. Método de Dilución Crítica**

Este método fue desarrollado por Jacob y col. adaptado de la metodología utilizada para el recuento de bacteriófagos y consiste básicamente en preparar una serie de diluciones de la muestra a comprobar, la deposición de gotas uniformes de cada dilución sobre agar que ha sido inoculado con una determinada cantidad de un microorganismo indicador y por último el examen visual de la zona de inhibición.

### **2. Método del Recuento de Sobrevivientes**

Basándose en la premisa que las bacteriocinas son unidades que se fijan a la pared bacteriana; una por cada bacteria, se establece el número de sobrevivientes de acuerdo al recuento de bacterias que no han absorbido la molécula de bacteriocina; determinando así el poder letal y concentración de la bacteriocina.

### **3. Método de Zona de Difusión**

Aprovechando la propiedad de difusión por parte de casi todas las bacteriocinas se ha desarrollado una técnica que permite al compuesto en estudio a difundirse en el agar a través de pozos de aproximadamente 4 mm de diámetro, en los cuales se deposita la bacteriocina,

se permite su difusión y luego se agrega una segunda capa de agar inoculado con el microorganismo indicador.

#### 4. Método de Recuento de Lacuna

Esta técnica fue adaptada también del estudio de bacteriófagos y se basa en la eliminación de las células bacterianas crecidas en agar con la posterior formación de "lagunas" (de donde se deriva el nombre del método) que contienen la bacteriocina la cual es cuantificada por las diluciones realizadas ante un microorganismo indicador. <sup>(34,50,29,6,32,45,46,41,49)</sup>

Todas las técnicas hasta ahora utilizadas por los diversos autores presentan un común denominador el cual consiste en definir arbitrariamente la unidad de actividad de bacteriocina (AU) y está basada, independientemente del método utilizado, sobre la hipótesis de ser la mínima cantidad necesaria para eliminar al microorganismo indicador en una determinada proporción, variando de método en método por la naturaleza del mismo, por la composición y mecanismo de acción de la bacteriocina y la capacidad de fijación a cada microorganismo indicador. <sup>(34,50,39,38,28,37,30)</sup>

Para poder cuantificar y caracterizar la actividad de una determinada bacteriocina, se debe proveer de ciertas condiciones al cultivo de la cepa productora. Mientras más exigente sea la cepa madre, en algunos casos se obtiene mayor concentración de bacteriocina por cantidad de cultivo, pero su purificación se torna un poco más complicada, debido a la mayor cantidad de solutos de mayor peso molecular presentes en el medio de cultivo. Además, existen otros factores que alteran de una manera no precisada exhaustivamente para cada cepa, la producción de bacteriocina, entre los cuales se pueden mencionar el pH, temperatura, fuerza iónica y otros. Otros medios de inducción utilizados por diversos autores incluyen luz ultravioleta, presencia de cristal violeta, privación de timina, etc. <sup>(34,50,9,32,38,41,28,5,58)</sup>

La solución donde se ha cultivado la cepa productora de bacteriocina debe ser neutralizada para eliminar la actividad del ácido láctico, que posee actividad antimicrobiana. Posteriormente se debe agregar a dicha solución catalasa o peroxidasa para evitar la interferencia del peróxido de hidrogeno, el cual también presenta actividad antimicrobiana. Y por último, se procede a esterilizar la solución del cultivo por medio de filtración con un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ . <sup>(34,50,9,32,46,41,28,37,30)</sup>

Las bacterias ácido lácticas emiten una gran diversidad de compuestos tóxicos hacia otras bacterias tales como ácido láctico, peróxido de hidrogeno, diacetyl, etc; y por medio de mecanismos de competencia bacteriana se han constituido como potenciales biopreservantes en la industria de alimentos. Sin embargo, hasta la fecha se ha realizado muy poca investigación utilizando estas bacterias con sus respectivas bacteriocinas en las diversas matrices de alimentos y se han reportado unos pocos trabajos mencionando la utilización de estos microorganismos y/o sus compuestos en la desinfección de retoños de alfalfa, la cual hasta el día hoy sigue siendo un reto para los países industrializados. <sup>(14,5)</sup>

Se han reportado algunos estudios de diversos autores donde se ha logrado la inhibición parcial de patógenos tales como *Escherichia coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes* por

medio de la utilización de bacteriocinas en alimentos tales como embutidos y lácteos. Dichos trabajos de investigación sugieren que las bacteriocinas pueden ser utilizadas como mecanismo de inhibición alternos y/o superiores en algunos casos, a los métodos convencionales utilizados para el procesamiento y fabricación de estos tipos de alimentos <sup>(39, 32,46,57,55,28)</sup>.

### III. JUSTIFICACIONES

En la actualidad el consumo de retoños de alfalfa y soya han sido implicados en una serie de brotes de ETA´s a nivel internacional y aún no se conoce un tratamiento de la semilla de alfalfa que represente un 100 % de efectividad en la desinfección de la misma o por lo menos a niveles estadísticamente aceptables.

Debido a que el tratamiento químico de la semilla de alfalfa y semilla de soya no reduce a niveles mínimos la concentración de *Salmonella* sp y *Escherichia coli* 0157:H7 en la misma y constituye hasta ahora el método recomendado por organizaciones regulatorias en los Estados Unidos y la utilización de agentes biológicos posterior a la desinfección química puede constituir una mejora significativa en el tratamiento de la semilla y desarrollo del producto, obteniendo por lo tanto una producción de retoños más segura.

De ser efectivos, se pueden utilizar dichos esquemas o mecanismos de desinfección y control de microorganismos, en alimentos perecederos de consumo masivo o en alimentos que hayan sido identificados como factores de riesgo en brotes o intoxicaciones alimentarias para la población en general.

## IV. OBJETIVOS

### A. Generales:

- Conocer la eficacia de la utilización de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas en la desinfección de la semilla de alfalfa y soya.
- Investigar si dichos métodos afectan la calidad de germinación de la semilla

### B. Específicos:

- Determinar si la utilización de BAL posterior a la desinfección química presentan una mejor efectividad en la desinfección de la semilla que utilizando sólo el agente químico
- Monitorear y comparar la eficacia del tratamiento de la semilla con y sin bacteriocinas en el desarrollo de los retoños
- Comparar la eficacia del control de crecimiento de *Salmonella* sp., *Escherichia coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes* en los retoños de alfalfa y soya de semillas tratadas con cepas de bacterias ácido lácticas contra cepas de dichas bacterias no productoras de bacteriocinas.

## **V. HIPÓTESIS**

LA EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO DE SEMILLAS DE ALFALFA Y SOYA CON CLORO A 20,000 PPM Y SU POSTERIOR TRATAMIENTO CON CULTIVOS DE CEPAS DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS ES SUPERIOR A LA EFECTIVIDAD DE LA UTILIZAR UNICAMENTE CLORO EN EL CONTROL DE SALMONELLA SP. , E. COLI 0157:H7 y LISTERIA MONOCYTOGENES EN LA PRODUCCION DE RETOÑOS.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo:

Semillas de alfalfa inoculadas individualmente con *Salmonella sp.*, E coli 0157:H7 y *Listeria monocytogenes*.

Semillas de soya inoculadas individualmente con *Salmonella sp.*, E coli 0157:H7 y *Listeria monocytogenes*.

### B. Medios:

#### 1. Recursos humanos:

Lic. Victor Jimenez (Investigador)

Licda. Teresita de Miranda (Colaborador)

Dr. Fernando Maúl (Asesor)

#### 2. Recursos institucionales

Laboratorio Nacional de Salud

#### 3. Recursos materiales

Materiales y equipo

Autoclave Market Forge SM321 1996

Incubadora MARCA LAB-LINE MODELO 310 1999

Baños de María PRECISION MODELO SM-675 1989

Balanza Mettler MODELO PM-600

Cámara Fría MARCA HUSSMANN U65

Pinzas

Espátulas de acero inoxidable

Pipetas Pasteur

Pipetas serológicas de 5 ml

Cajas de Petri estériles desechables

Cajas de Petri estériles de vidrio

Centrifuga

Filtros estériles con membrana de acetato de celulosa de 0.2  $\mu$ m

Bomba de vacío

Jarras Gas-Pak

#### c.2) Medios de Cultivo y Reactivos

Agar XLT<sub>4</sub>

Agar Tripticasa Soya

Agua Peptonada 0.1 %

Agua desmineralizada estéril

Agar Rambach

Caldo Tripticasa Soya

Agar MRS

Caldo MRS

Glucosa

Agar Oxford

Agar McConkey Sorbitol

## c. Metodología

### 1. Cepas de microorganismos

Para el presente estudio se preparará un cultivo con 3 cepas de *Salmonella sp.*, 3 cepas de *E. coli* 0157:H7 y una cepa de *Listeria monocytogenes* todas provenientes del cepario del Laboratorio Nacional de Salud con excepción de una cepa de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 provista por la Licda. Florencia Moguel de Laboratorios INLASA, las cuales servirán para inocular las semillas de alfalfa y soya. Las cepas *L. acidophilus* N2 y 88 fueron donadas generosamente por el Dr. Montville de la Universidad de RUTGERS USA, las cepas de *P. acidilacti* por el Dr. Colin Hill de la Universidad de College Cork Irlanda y del Dr. Klaenhammer, las cepas *Lactobacillus sake* LB706 por los doctores Ulrich Schillinger de la Universidad de Karlsruhe y Dr. Lars Axelsson de MATFORSK, y la cepa CRNZ481 fue donada generosamente por el Dr. Piard del INRA

### 2. Semillas

Las semillas de alfalfa se obtendrán de International Speciality Supply (Cookeville, Tenn.) las cuales vienen empacadas en un saco de polipropileno identificado con su número de lote respectivo. Las semillas de soya serán obtenidas de manera local en mercados de consumo popular.

### 3. Preparación de los inóculos de Patógenos.

- a) Cultivar cada una de las 3 cepas de *Salmonella sp.*, las 3 cepas de *E. coli* 0157:H7 y las 2 cepas de *Listeria monocytogenes*, por individual en dos recipientes que contengan 500 ml. de caldo tripticosa soya (pH 7.3, Laboratorios Difco, Detroit, Michigan) por 24 horas a 35 °C en un recipiente estéril. Diluir cada una de los recipientes hasta obtener un recuento de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml.
- b) Determinar el recuento de *Salmonella sp.* por mililitro en agar XLT<sub>4</sub> (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan) y agar Rambach (Merck), determinar el recuento de *Escherichia coli* 0157:H7 en agar Sorbitol MacConkey (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan) y determinar el recuento de *Listeria monocytogenes* en agar Oxford (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan).

### 4. Contaminación de la semillas con los diversos patógenos.

- a) Agregar 454 gramos de semilla de alfalfa y soya por separado a cada cultivo de las 3 cepas de *Salmonella sp.* con una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml preparado como se indica en el párrafo anterior.
- b) Dejar la semilla sumergida por 15 minutos.
- c) Decantar el inóculo y depositar las semillas en una bandeja estéril con papel encerado para ser secadas en flujo laminar a temperatura ambiente por 24 horas.
- d) Las semillas inoculadas serán evaluadas para determinar el recuento de *Salmonella sp.*, el cual deberá oscilar alrededor de  $1 \times 10^6$  UFC/gramo de semilla.

- e) Agregar 454 gramos de semilla de alfalfa y soya por separado a cada cultivo de las 3 cepas de *E coli* 0157:H7 con una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml preparado como se indica en el párrafo anterior.
- f) Dejar la semilla sumergida por 15 minutos.
- g) Decantar el inóculo y depositar las semillas en una bandeja estéril con papel encerado para ser secadas en flujo laminar a temperatura ambiente por 24 horas.
- h) Las semillas inoculadas serán evaluadas para determinar el recuento de *E coli* 0157:H7, el cual deberá oscilar alrededor de  $1 \times 10^6$  UFC/gramo de semilla.
- i) Agregar 454 gramos de semilla de alfalfa y soya por separado a cada cultivo de las 2 cepas de *Listeria monocytogenes* con una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml preparado como se indica en el párrafo anterior.
- j) Dejar la semilla sumergida por 15 minutos.
- k) Decantar el inóculo y depositar las semillas en una bandeja estéril con papel encerado para ser secadas en flujo laminar a temperatura ambiente por 24 horas.
- l) Las semillas inoculadas serán evaluadas para determinar el recuento de *Listeria monocytogenes*, el cual deberá oscilar alrededor de  $1 \times 10^6$  UFC/gramo de semilla.

## 5. Preparación del cultivo de bacterias ácido lácticas

- a) Inocular en 12 tubos cónicos estériles de 50 ml. con caldo 25 ml. de MRS (Difco) con cada una de las siguientes BAL:
  - 1) *Pediococcus acidilacti* Pac1
  - 2) *Pediococcus acidilacti* NCK27C
  - 3) *Pediococcus acidilacti* NCK 137
  - 4) *Pediococcus acidilacti* PO2
  - 5) *Pediococcus acidilacti* PO2k5
  - 6) *Lactococcus lactis* ATCC 9338
  - 7) *Lactococcus lactis* CRNZ 481
  - 8) *Lactococcus lactis* R-3108
  - 9) *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469
  - 10) *Lactococcus lactis* R-3110
  - 11) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014
  - 12) *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830
- b) Incubar de 18 a 24 horas a 30°C
- c) Centrifugar cada cultivo a 5000 rpm por 10 minutos
- d) Decantar los sobrenadantes
- e) Ajustar a pH  $6.5 \pm 2$
- f) De cada una de las bacterias ácido lácticas para tratar las semillas, inocular 100 ml de caldo MRS (pH 6.8) e incubar a 30 °C por 18 – 24 horas

## 6. Determinación de la actividad bacteriológica

- 1) "Agar Spot-Test" (tomado de Schillinger y Lücke<sup>45</sup>)
  - a) Picar cada una de las 13 cepas a comprobar (ver párrafo "Preparación de cultivo de bacterias ácido lácticas") sobre una placa de agar MRS (que contiene 0.2 % de glucosa y 1.2 % de agar)
  - b) Incubar de 20 a 24 horas a 25 °C en condiciones anaeróbicas con Gas-Pak
  - c) Inocular aproximadamente  $5 \times 10^7$  células de (*Salmonella sp.*, *E coli 0157:H7* y *Listeria monocytogenes* por separado) a 7 ml. de agar TSA líquido a 45 °C.
  - d) Verter el agar inoculado con el patógeno sobre el agar donde fueron picadas las cepas a comprobar.
  - e) Incubar a 25 °C por 24 horas
  - f) Revisar y observar halos de inhibición. Los halos de 0.5 mm o mayores son considerados como inhibitorios.
  
- 2) Prueba de difusión (tomado de Schillinger y Lücke<sup>45</sup>)
  - 1) Verter 15 ml de agar TSA en una placa de Petri. Dejar solidificar.
  - 2) Agregar 7 ml de agar TSA al cual se le ha agregado 0.3 ml de un cultivo de 24 h del patógeno a probar, sobre los primeros 15 ml de agar
  - 3) Con una micropipeta, depositar sobre el agar 10 ul de sobrenadante neutralizado de la cepa a comprobar (ver párrafo "Preparación de cultivo de bacterias ácido lácticas")
  - 4) Incubar en anaerobiosis (GasPak) a 25 °C por 24 h
  - 5) Revisar y observar halos de inhibición. Los halos de 0.5 mm o mayores son considerados como inhibitorios.

## 7. Tratamiento con cloro de las semillas inoculadas con los patógenos.

- 1) Sumergir por 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 20,000 ppm de cloro residual, 20 gramos de la semilla inoculada por cada cepa de patógeno de manera individual.
- 2) Lavar con agua destilada estéril para remover el exceso de cloro por 5 minutos
- 3) Efectuar el recuento microbiológico para determinar la concentración del patógeno de interés por gramo de semilla
- 4) Pesar 1 porción de 10 gramos de semilla inoculada sin cloro y utilizarla como control.

## 8. Tratamiento con el cultivo de bacterias ácido lácticas, de las semillas inoculadas con los patógenos

- 1) Pesar porciones de 20 gramos cada una de semilla de alfalfa y soya inoculada con cada una de las cepas de patógenos por individual. tratada con cloro y sumergirlas por 24 horas en 50 ml de los cultivos de bacterias ácido lácticas cuya preparación fue descrita anteriormente.
- 2) Pesar 1 porción de 10 gramos de semilla inoculada tratada con cloro y dejarla como control

## 9. Análisis microbiológico de las semillas

### 1) Recuento de *Salmonella*

- a) Pesar 10 gramos de cada porción de semilla tratada con los diversos cultivos de bacterias ácido lácticas y diluirla en 20 ml de agua peptonada 0.1 % en una jarra estéril de licuadora para su homogenización por 30 segundos.
- b) Diluir de la solución madre en agua peptonada 0.1 % hasta obtener las diluciones requeridas.
- c) Sembrar 0.1 ml de la dilución  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  en una placa de agar Tripticasa Soya por duplicado por dilución y distribuir sobre la superficie del mismo.
- d) Incubar 2 horas a 35 °C.
- e) Agregar 7 ml de agar XLT<sub>4</sub> sobre la superficie de cada caja de Petri.
- f) Incubar por 18- 24 horas a 35 °C.
- g) Efectuar el recuento de *Salmonella sp.* por cada muestra de semilla.

### 2) Recuento de *Escherichia coli* 0157:H7

- a) Pesar 10 gramos de cada porción de semilla tratada con los diversos cultivos de bacterias ácido lácticas y diluirla en 20 ml de agua peptonada 0.1 % en una jarra estéril de licuadora para su homogenización por 30 segundos.
- b) Diluir de la solución madre en agua peptonada 0.1 % hasta obtener las diluciones requeridas.
- c) Sembrar 0.1 ml de la dilución  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  en una placa de agar Tripticasa Soya por duplicado por dilución y distribuir sobre la superficie del mismo.
- d) Incubar 2 horas a 35 °C.
- e) Agregar 7 ml de agar CT-MacConkey-Sorbitol sobre la superficie de cada caja de Petri.
- f) Incubar por 18- 24 horas a 35 °C.
- g) Efectuar el recuento de *Escherichia coli* 0157:H7 por muestra de semilla.

### 3) Recuento de *Listeria monocytogenes*

- h) Pesar 10 gramos de cada porción de semilla tratada con los diversos cultivos de bacterias ácido lácticas y diluirla en 20 ml de agua peptonada 0.1 % en una jarra estéril de licuadora para su homogenización por 30 segundos.
- i) Diluir de la solución madre en agua peptonada 0.1 % hasta obtener las diluciones requeridas.
- j) Sembrar 0.1 ml de la dilución  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  en una placa de agar Trypticase Soya por duplicado por dilución y distribuir sobre la superficie del mismo.
- k) Incubar 2 horas a 35 °C.
- l) Agregar 7 ml de agar Oxford sobre la superficie de cada caja de Petri.
- m) Incubar por 18- 24 horas a 35 °C.
- n) Efectuar el recuento de *Listeria monocytogenes* por muestra de semilla.

## **10. Efecto de los tratamientos en las semillas**

Para evaluar la viabilidad de las semillas posterior a su tratamiento, se dispondrán 100 semillas de cada grupo sobre papel filtro humedecido con agua destilada estéril para observar su porcentaje de germinación por 48 horas, anotando el porcentaje de germinación de las semillas después de cada método de desinfección utilizado

## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Como parte de la selección de las cepas a utilizar en los retoños se procederá a evaluar el grado de inhibición en agar spot test y difusión en pozo, tomando en cuenta el tamaño del halo de inhibición obtenido. Dicha evaluación será realizada por triplicado y se estimarán los promedios de los grupos y sus respectivas varianzas.

De todas las cepas se escogerán las que presenten mayor halo de inhibición y se procederá a inocular la semilla de alfalfa y la semilla de soya con la cepas de *Salmonella sp*, *Escherichia coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes* cada una para comparar el grado de eliminación del patógeno con las cepas seleccionadas.

Todos los procedimientos serán replicados con un nivel de confianza del 90 % donde el valor de n (repeticiones) es

$$\begin{aligned}n &= \frac{2 (nc)^2 \phi^2}{\Delta^2} \\ &\text{donde } \phi^2 = \Delta^2 \\ &= 2 nc^2 \\ &= 2 (z_{1-\alpha/2})^2 \\ &= 2 (1.68)^2 \\ &= 2 (2.8224) \\ &= 6 \text{ repeticiones}\end{aligned}$$

Posteriormente se restará el recuento post tratamiento del recuento inicial obtenido después de la inoculación y se obtendrá el promedio de diferencia en UFC/gramo de la carga bacteriana por tratamiento. Es decir:

Nivel de reducción bacteriana = (LOG UFC/g INICIAL – LOG UFC/g DESPUES DEL TRATAMIENTO)

Así se efectuará un análisis de varianza (PRUEBA F) asumiendo que no existe diferencia significativa entre los métodos de acuerdo a

$$H_0 : u_1 = u_2 = u_3 = u_4$$

Ha : Existe diferencia en por lo menos uno de los tratamientos

$k = 4$

Grados de libertad: 3

Donde el valor de la tabla nos indica que  $F = 19.16$ , con el cual se concluirá la igualdad de la eficacia de los métodos. Si existe una diferencia entre los métodos utilizados, se procederá a determinar cual método la presenta por medio del calculo de la mínima diferencia significativa de Fisher.

Los porcentajes de germinación serán asociados a cada método en particular descritos en forma gráfica utilizando gráfica de barras.

## VIII. PROGRAMACIÓN

ACTIVIDAD	SEMANA									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PREPARACION DE REACTIVOS Y SEMILLA	X									
INOCULACION DE LA SEMILLA		X								
PRIMER SET DE TRATAMIENTOS			X							
SEGUNDO SET DE TRATAMIENTOS				X						
TERCER SET DE TRATAMIENTOS					X					
ANALISIS DE DATOS						X	X	X		
GENERACION DE CONCLUSIONES									X	
ELABORACION DE REPORTE										X

## IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### A. Inhibición in vitro de patógenos

Las Tablas No. 3 y No. 4 (Anexos) presentan la inhibición de las diferentes cepas de BAL hacia las 3 cepas de *Salmonella*, es decir, ATCC 14028, 13046 y 13076. El grado de inhibición reportado en las diversas cepas en la mayoría de cepas fue negativo es decir un radio de inhibición menor de 0.1 mm. Algunas cepas de BAL presentaron una inhibición parcial (radio menor de 0.5 mm.), especialmente las cepa de *Lactococcus lactis* CRNZ 481, la cual presentó una inhibición parcial tanto para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *S. arizonae* ATCC 13046. En la inhibición por medio del spot test se presentó un cuadro similar al de la prueba de difusión presentando inhibición parcial por medio de *Lactococcus lactis* R-3108.

Es de importancia que a pesar de no haberse presentado una inhibición marcada por parte de las cepas de BAL hacia las cepas de *Salmonella* existe una moderada concordancia entre ambas pruebas lo cual puede deberse a que cepas tales como la mencionada en el párrafo anterior presente un antagonismo en particular contra *Salmonella sp.* Este antagonismo leve presentado puede deberse a la producción de bacteriocinas ya que no aumentó la inhibición del spot test en comparación con la prueba de difusión.

Cabe mencionar que los métodos para evaluar antagonismo bacteriano no han sido estandarizados para todo tipo de bacteria tanto indicadora como objetivo. Las moléculas de bacteriocinas se difunden a diferente velocidad a través del agar y la combinación de las mismas junto con compuestos tóxicos para determinadas bacterias no ha sido plenamente descrito. Los factores que influyen de manera principal sobre estos factores de inhibición son el pH del medio, porcentaje de agar en el medio de cultivo de prueba, presencia de oxígeno, etc.

Tal como se observa en las Tablas No. 5 y 6 (Anexos), la inhibición in vitro por medio de la prueba de difusión, de las cepas de *Escherichia coli* 0157:H7 resultó ser más marcado por parte de las cepas de BAL, en general al compararla con la presentada por las mismas cepas hacia especies de *Salmonella*. Para las cepas de *E. coli* 0157:H7 ATCC 35150 y LUCAM-95 casi todas las cepas de BAL presentaron una inhibición parcial. En el caso de ATCC 35150 presentaron inhibición de mayor grado, las cepas *Pediococcus acidilacti* PAC 1 y NCK27C, mientras que para la cepa ATCC 700728, se presentaron menos cepas inhibitorias de BAL pero las cepas PO2, PO2K5 y ATCC 9338 presentaron una inhibición completa para la misma. En el caso particular de la cepa LUCAM-95, las cepas *Lactococcus lactis* R-3108 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, presentando con casi todas las demás cepas de BAL una inhibición parcial. Todo lo contrario se observa por medio de la prueba de spot test, en la cual se observa que casi todas las cepas presentan una inhibición parcial o ninguna en la mayoría de cepas de BAL. Así mismo como fue explicado en el caso de *Salmonella sp.*, existen factores no controlados que afectan el desempeño de las pruebas in vitro, los cuales mejoran o dificultan la inhibición bacteriana.

Las Tablas No. 7 y 8 sugieren que el antagonismo presentado para *Listeria monocytogenes* se caracteriza en la prueba de difusión, por presentar una inhibición parcial por parte de varias cepas de BAL, pero es de considerar el tamaño del halo de inhibición que es sumamente pronunciado; para lo cual se calificó con un signo “++”. Esto también se presenta en el spot test para ambas cepas de *Listeria* puestas como objetivo. Los halos de estas bacterias oscilaban entre los 20-25 mm, denotando aparentemente una inhibición muy agresiva.

Como se reporta en la literatura la inhibición para gram positivo (*Listeria monocytogenes*) es mayor que para bacterias gram negativo, lo cual se evidencia no en la frecuencia, pero si en el tamaño de los halos de inhibición obtenidas en ambas pruebas <sup>(39,46)</sup>.

### **Selección de las cepas de BAL**

En la Tabla No.9 (Anexo No.2) se presentan, las cepas seleccionadas para tratar la semilla infectada para cada uno de los patógenos por individual. Esta selección se realizó considerando:

- a) la frecuencia de inhibición hacia el microorganismo objetivo y
- b) el grado de inhibición obtenido para cada cepa

Así las cepas escogidas con mayor frecuencia debido a su efectividad, fueron *Lactococcus lactis* CRNZ 481, *Lactococcus lactis* R-3108, R-3110 y particularmente *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. En el criterio de selección de las cepas predominó la importancia del spot test sobre la prueba de difusión. Esto se debe a que en el spot test se evidencia la existencia de un mecanismo combinado de inhibición conformado por peróxido de hidrógeno, diacetil y otras moléculas que poseen un efecto bacteriostático, solas o combinadas, lo cual junto con la bacteriocina, pueden constituir un sistema de eliminación bacteriano altamente efectivo.

En el caso particular de la bacteria *Escherichia coli* 0157:H7 LUCAM-95, se observa que prácticamente no hay inhibición in vitro por parte de las cepas de BAL en ambas pruebas, por lo cual se decidió aleatoriamente escoger cuales cepas lácticas utilizar en la prueba in vivo (semillas).

Cabe mencionar que las cepas R-3108 y R-3110 son aisladas de un producto comercial destinado por su fabricante para inhibir cepas patógenas en productos lácteos, lo cual puede ser causante de su eficacia para ser incluida en el estudio in vivo.

La cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 fue la cepa que más fue seleccionada en contra las diversas cepas de patógenos. Esta cepa no se encuentra catalogada como una productora de bacteriocinas neta; sin embargo, presentó un poder de inhibición relevante en las pruebas in vivo. Otra cepa seleccionada con relativa frecuencia fue el *Lactococcus lactis* CRNZ 481, la cual si se encuentra catalogada por el Dr. Piard, como una cepa de alto poder inhibitorio (comunicación personal con el Dr. Piard).

Otro aspecto a considerar es el bajo poder de inhibición de las BAL en general hacia las cepas de *Salmonella* sp, *Escherichia coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes*, presentando en su mayoría, un grado de antagonismo poco relevante, de acuerdo a lo reportado por la literatura internacional, la cual define una inhibición positiva, como un halo de 5 mm en adelante. La razón de haber utilizado cepas con inhibición parcial, según lo definido en este estudio, como un halo de inhibición de 1 a 5 mm, es porque en el antagonismo in vivo, intervienen otros compuestos de coadyuvan en la destrucción de otras bacterias.

### **Absorción de Patógenos por parte de las Semillas de Alfalfa y Soya**

En el Tabla No.10 (Anexo No.3) se puede observar que al sumergir por 15 minutos las semillas de alfalfa y soya en caldo que contienen alrededor de  $2 \times 10^8$  UFC/ml de patógeno, la capacidad de ingreso de patógenos a las semillas oscila entre 400,000 hasta 4,300,000 UFC/g. Generalmente se puede observar que el recuento en las semillas de alfalfa es ligeramente superior que en las semillas de soya.

Esta diferencia de ingreso o fijación de patógenos entre ambos tipos de semilla, puede deberse a diversos posibles factores entre los cuales se mencionan:

- Mayor cantidad de absorción por parte de una de las semillas
- Capacidad de fijación de patógenos al interior de la semilla
- Factores propios antibacterianos de cada semilla

De los patógenos utilizados, la cepa que presentó menor concentración en ambas semillas fue *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 con un recuento de 450,000 UFC/g en la semilla de soya y la cepa que en general se fijó más a las semillas fue *Salmonella typhimurium* ATCC 13046. Se puede observar así mismo que la diferencia entre el inóculo inicial y los recuentos obtenidos de las semillas es de dos unidades logarítmicas, lo cual es normal en la inoculación de patógenos por medio de inmersión. En las inoculaciones por medio de inyección de bacterias, la recuperación es mucho mayor.

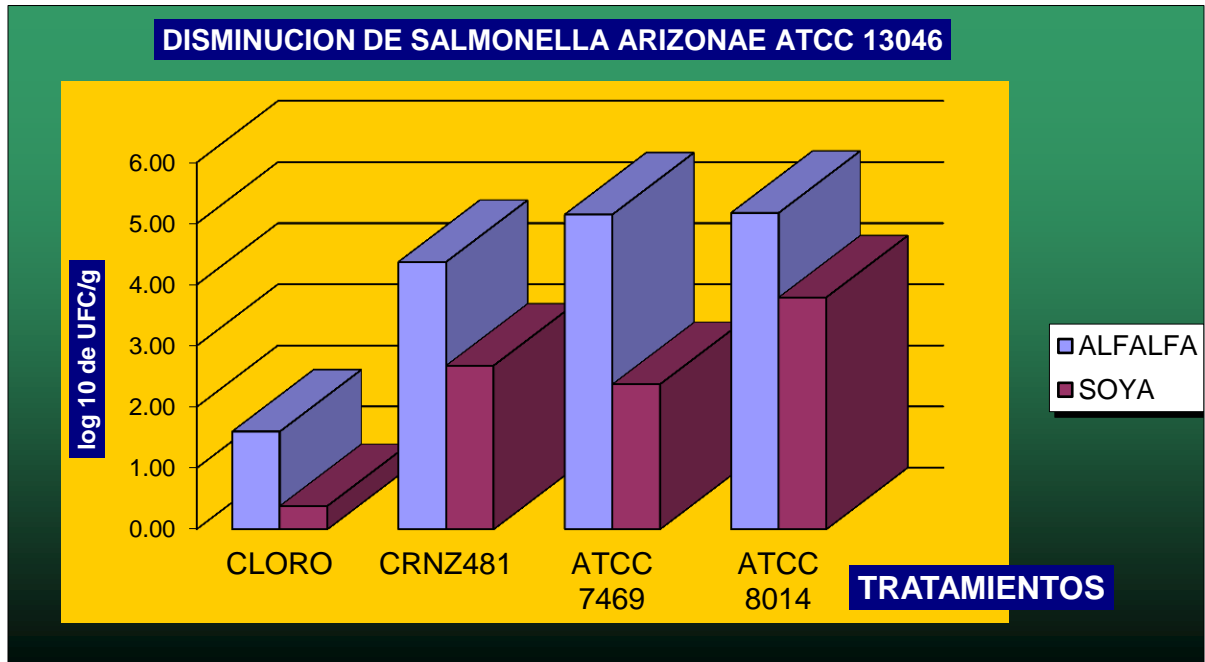
### **Inhibición in vivo por parte de las cepas de BAL.**

Inhibición de *Salmonella* spp.

La eliminación in vivo de *Salmonella arizonae* ATCC 13046 por parte de las cepas de BAL designadas para tal efecto, evidenciaron un mayor porcentaje de eliminación en las semillas de alfalfa logrando disminución hasta de 5.46 unidades logarítmicas (u.l.). El rango de inhibición se mantuvo relativamente alto y constante para las tres cepas seleccionadas, según se puede observar en la Figura No.3.

Figura No.3.

Inhibición de *Salmonella arizonae* ATCC 13046 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de Alfalfa y Soya



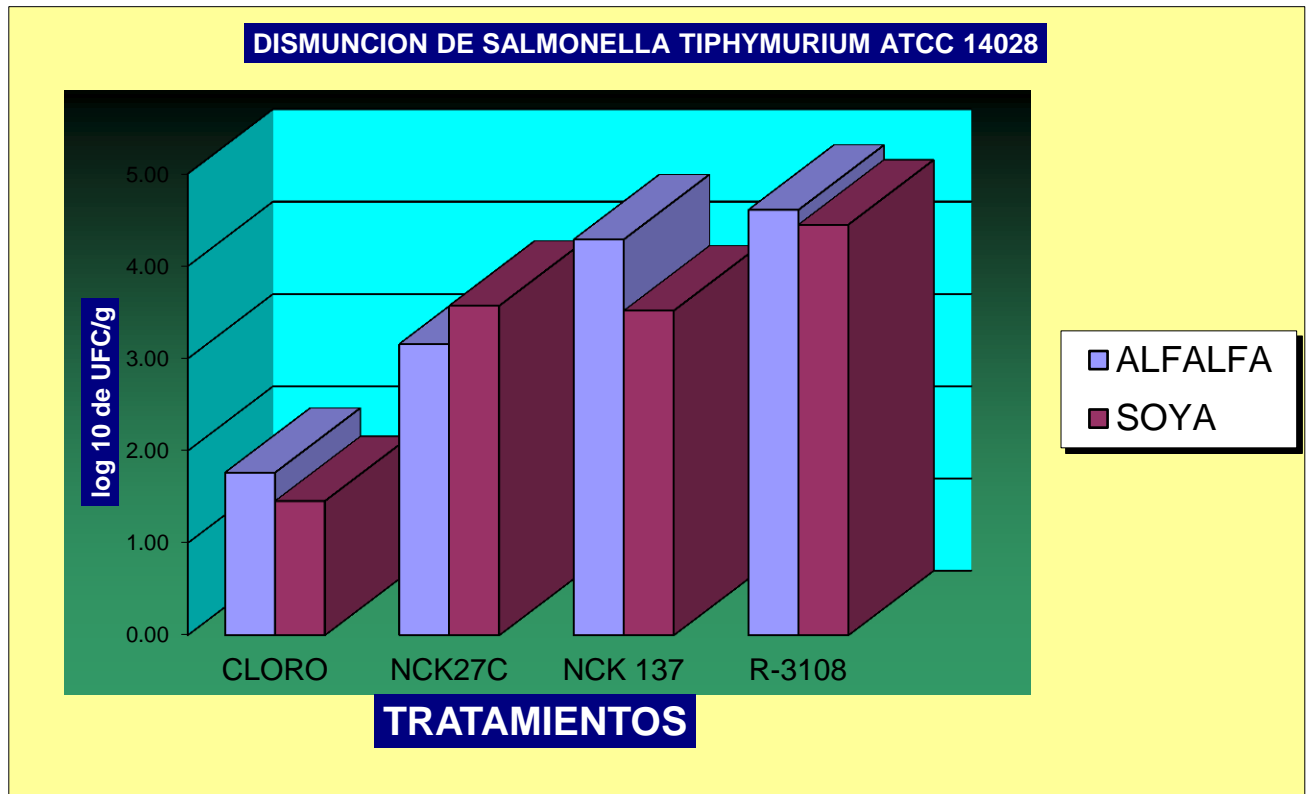
En este caso, así como en todos los demás casos, la disminución de la carga obtenida al tratar la semilla con cloro residual a 20,000 ppm, demostró que efectivamente tal como lo reporta la literatura, dicha disminución oscila entre 0 hasta 3 u.l.. Dicha disminución no es mayor debido a que como se explicó anteriormente, las bacterias logran ingresar a las grietas y rajaduras existentes en las semillas, lugar del cual no es posible eliminar por medio de un tratamiento químico de corta duración. Asimismo se utilizó hipoclorito de sodio en el presente estudio, obteniendo resultados similares a los obtenidos en la literatura, donde aparentemente se obtienen resultados levemente más altos utilizando hipoclorito de calcio.

En las semillas de soya se obtuvo una disminución de *S. arizonae* ATCC 13046 mucho más marcada utilizando *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, que con las otras dos cepas de BAL. Dicha disminución representa el doble de unidades logarítmicas de las obtenidas con *Lactococcus lactis* CRNZ 481 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

La eliminación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 por parte de las cepas de BAL, presentaron una capacidad de eliminación relativamente menor que para la cepa ATCC 13076 pero similar en ambos tipos de semillas. El rango de inhibición es más estrecho y oscila entre 3.01 hasta 4.89 u.l.. La inhibición con cloro fue levemente mayor que para la cepa ATCC 13076, pero no alcanza las 2 u.l.. El microorganismo con el se obtuvieron mejores resultados para ambas semillas fue *Lactococcus lactis* R-3108, logrando una tasa alrededor de 4.24 – 4.89 u.l., tal como se puede observar en la Figura No.4.

Figura No.4.

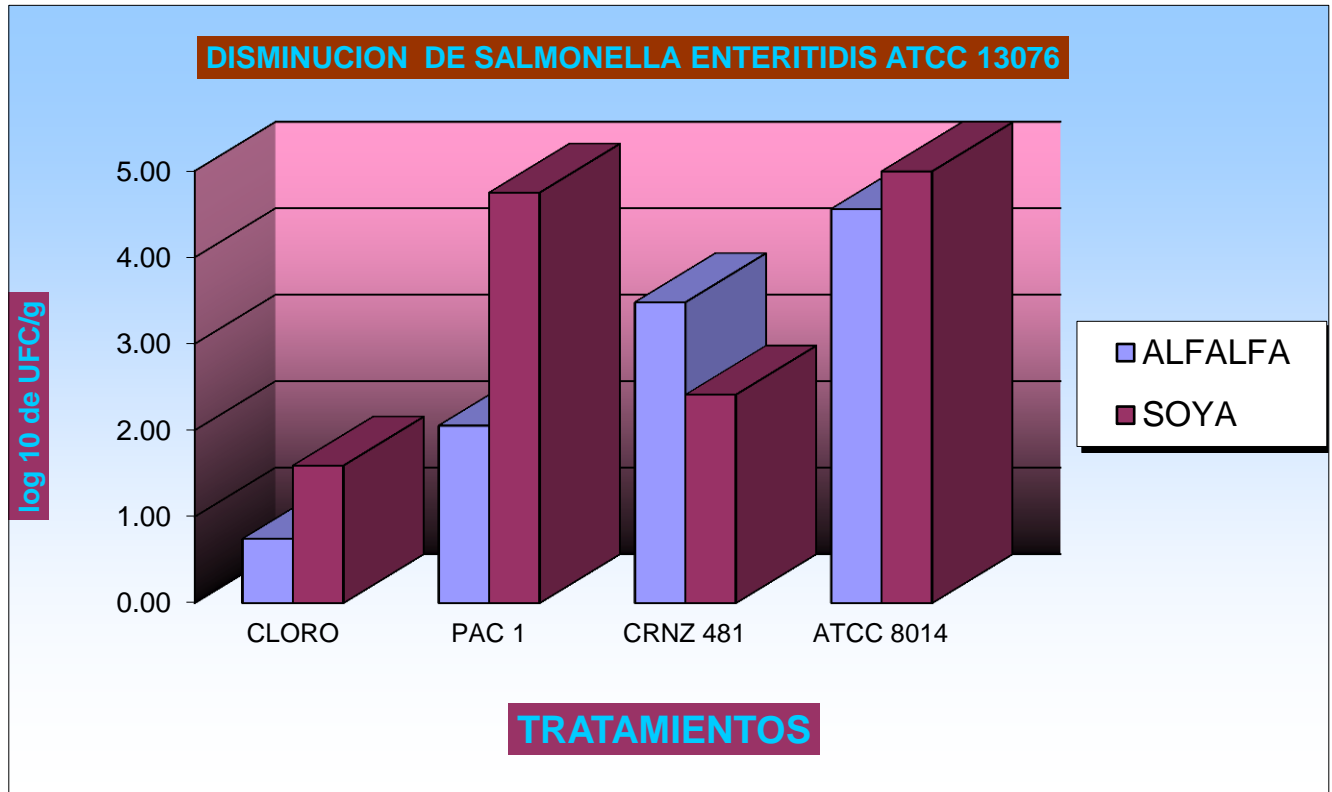
Inhibición de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de Alfalfa y Soya



La inhibición de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (Figura No. 5), presenta una mejor efectividad para la semilla de soya con las cepas *Pediococcus acidilacti* Pac1 y ATCC 8014, obteniendo resultados de alrededor de 4.99 u.l.. Hay que tomar en cuenta que la efectividad de antagonismo obtenida utilizando únicamente cloro a 20,000 ppm, no necesariamente es una condicionante para obtener mejores resultados con cepas de BAL. Dicho efecto se observa en varias cepas en las cuales se obtiene una inhibición pobre solo con cloro pero un resultado alto con el cultivo de BAL y así también se observan casos en los cuales la efectividad del cloro es levemente mayor pero la inhibición con BAL es menor.

Figura No. 5

Inhibición de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de Alfalfa y Soya



#### Inhibición de *Escherichia coli* 0157:H7

La disminución de *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC 35150 fue constante y similar para ambos tipos de semillas con promedio de efectividad de 2.14 u.l. El máximo valor de inhibición logrado fue de 3.85 y por lo mismo, la cepa seleccionada con mejor efectividad de disminución fue *Pediococcus acidilacti* PO2k5 *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC 700728, por su parte presenta efectos relativamente diversos entre sí, obteniendo desde 2.68 hasta 5.04 u.l., con los mejores resultados obtenidos por *Lactococcus lactis* ATCC 9338. La inhibición con cloro se mantiene relativamente similar a todas las obtenidas por las especies de *Salmonellas* p para ambos tipos de semillas. El antagonismo in vivo por parte las cepas de BAL para la cepa LUCAM-95, presenta un rango de disminución similar al obtenido por la cepa ATCC 700728. Hay que hacer notar que la cepa *Escherichia coli* 0157:H7 LUCAM-95 es una cepa aislada en el LUCAM ( Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos) en el año 1995 proveniente de una muestra de papaya. Dicha cepa ha sido preservada a lo largo de los años, pero no se establecido si posee resistencia antibiótica o ciertos plásmidos de resistencia contra otras bacterias, lo cual puede o no disminuir su resistencia a las cepas de BAL.

En general se observan para todas las cepas de *Escherichia coli* 0157:H7 un rango amplio de efectos de antagonismo amplio con las diversas cepas, logrando con algunas de ellas disminución de hasta 5 u.l., lo cual evidencia que pueden ser controladas o eliminadas en este tipo de semillas en una buena proporción, tal como se puede observar en las figuras No. 6,7 y 8 correspondientes a cada cepa probada.

Figura No. 6.

Inhibición de *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC 35150 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de Alfalfa y Soya

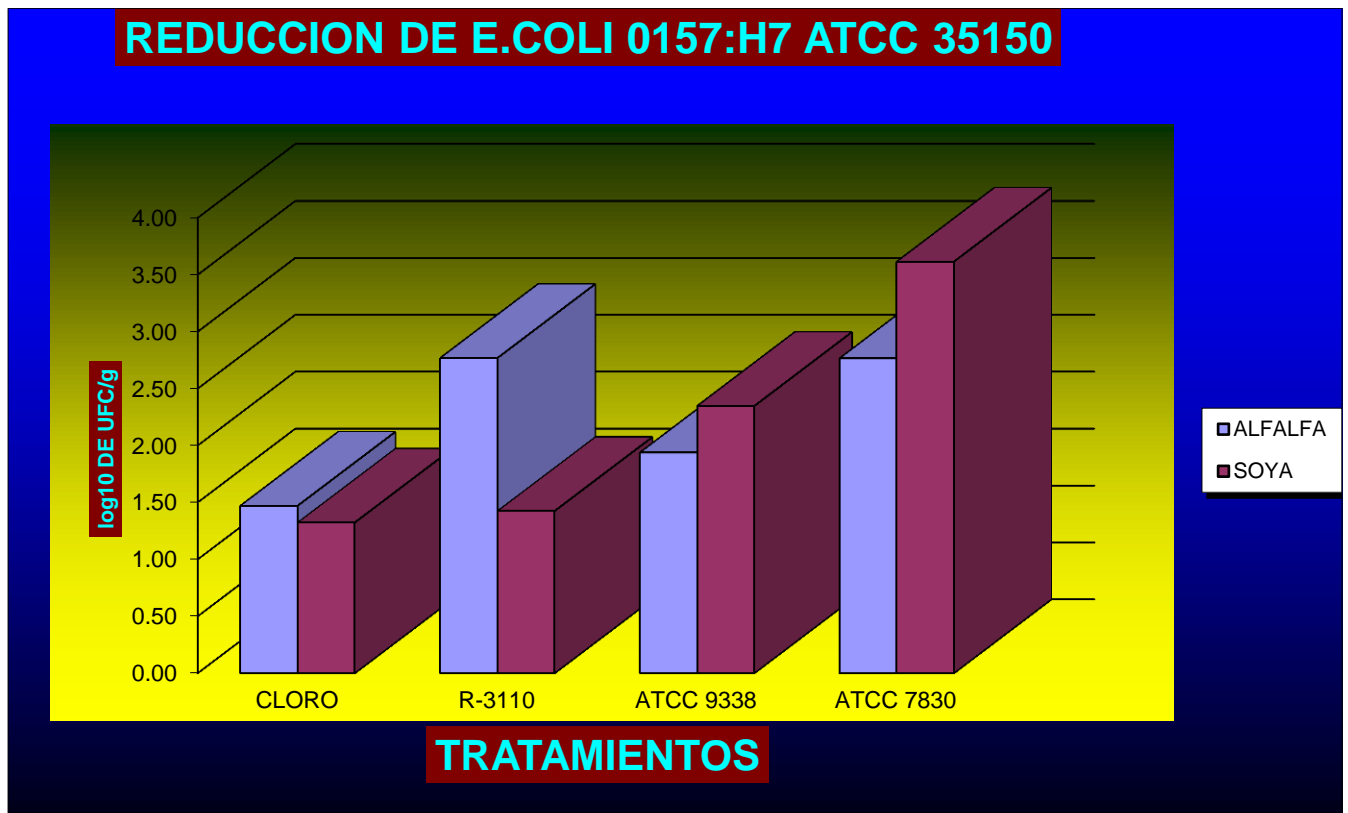


Figura No.7

Inhibición de *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC 700728 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de Alfalfa y Soya

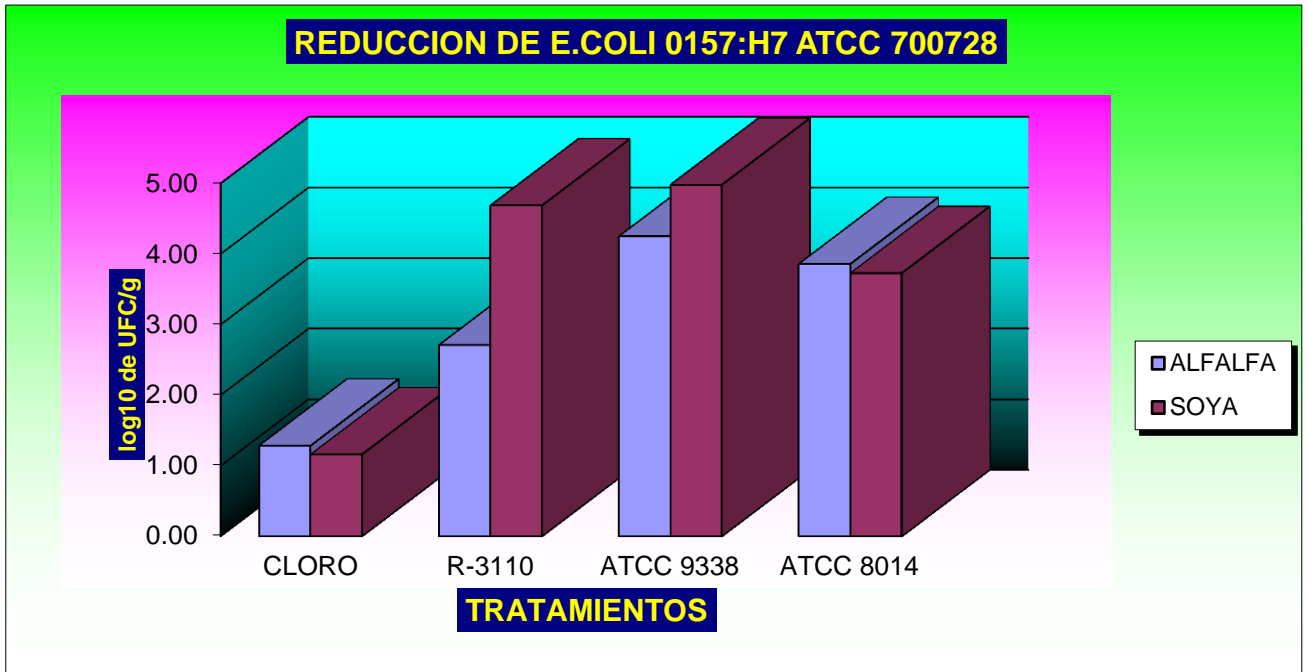
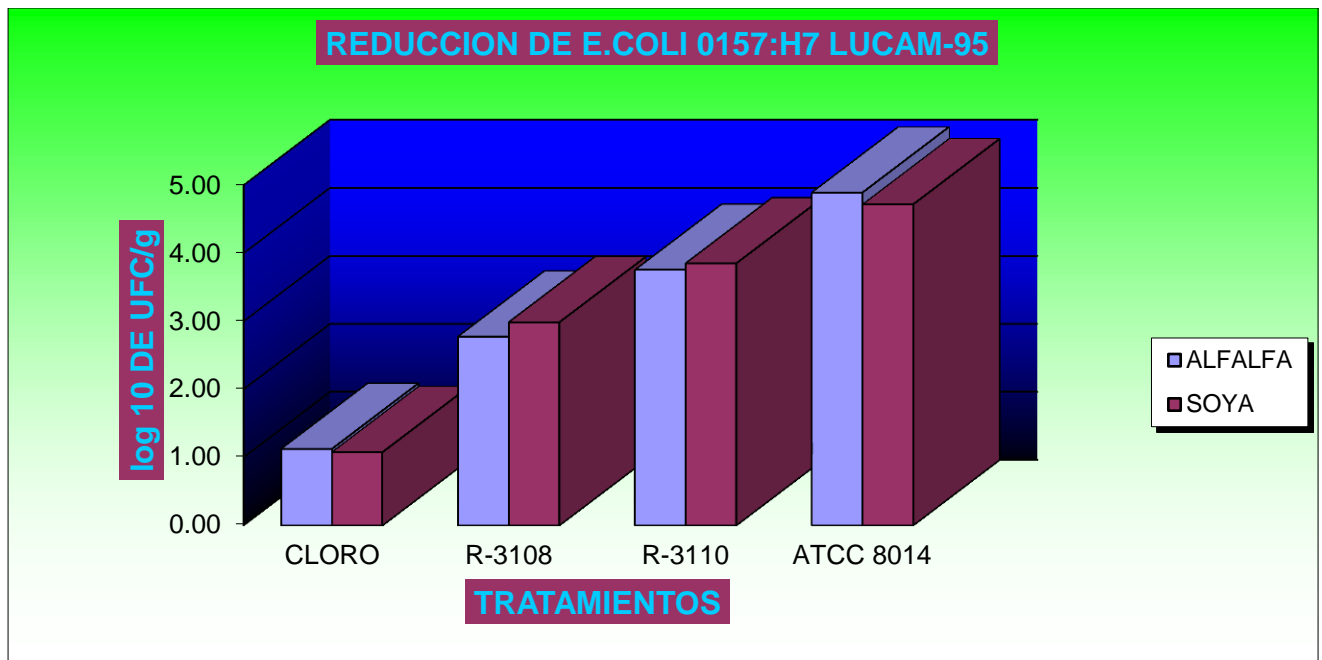


Figura No. 8

Inhibición de *Escherichia coli* 0157:H7 ECO por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de Alfalfa y Soya



## Inhibición de *Listeria monocytogenes*

La cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 fue inhibida por medio de *Pediococcus acidilacti* NCK27C de la mejor manera logrando también disminución hasta de 5 u.l., comparada con la carga inicial de las semillas. La semilla de soya presentó en general mejores resultados que la semilla de alfalfa y la disminución con cloro a 20,000 ppm se observa de manera similar a las obtenidas con las otras bacterias patógenas, tal como se observa en la Figura No. 9.

En la Figura No. 10 se puede observar que, la cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 984 presentó en general los menores índices de inhibición de todas las cepas de patógenos ensayadas, presentando antagonismo muy similar en algunos casos al obtenido por el cloro en el caso de la semilla de alfalfa. Esto se puede deber probablemente a resistencia natural de la bacteria a los mecanismos de ataque de las bacteriocinas y compuestos competidores, así como resistencia a condiciones extremas de supervivencia. En la semilla de soya, el efecto de disminución es levemente mayor.

Todos los caldos de crecimiento en los cuales se cultivó las cepas de BAL para tratar las semillas poseían un recuento de bacterias alrededor de  $1 \times 10^9$  UFC/ml al momento de utilizarse y un pH de 4. Este pH del caldo, junto a los demás compuestos tóxicos que producen las BAL, se constituyen en un buen "aniquilador" de muchas otras bacterias competidoras, lo cual puede en un futuro convertirse en una buena posibilidad de solución bacteriostática en alimentos que no sean altamente sensibles a pH tan bajo, así como los demás compuestos tóxicos.

Figura No.9

Inhibición de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de Alfalfa y Soya

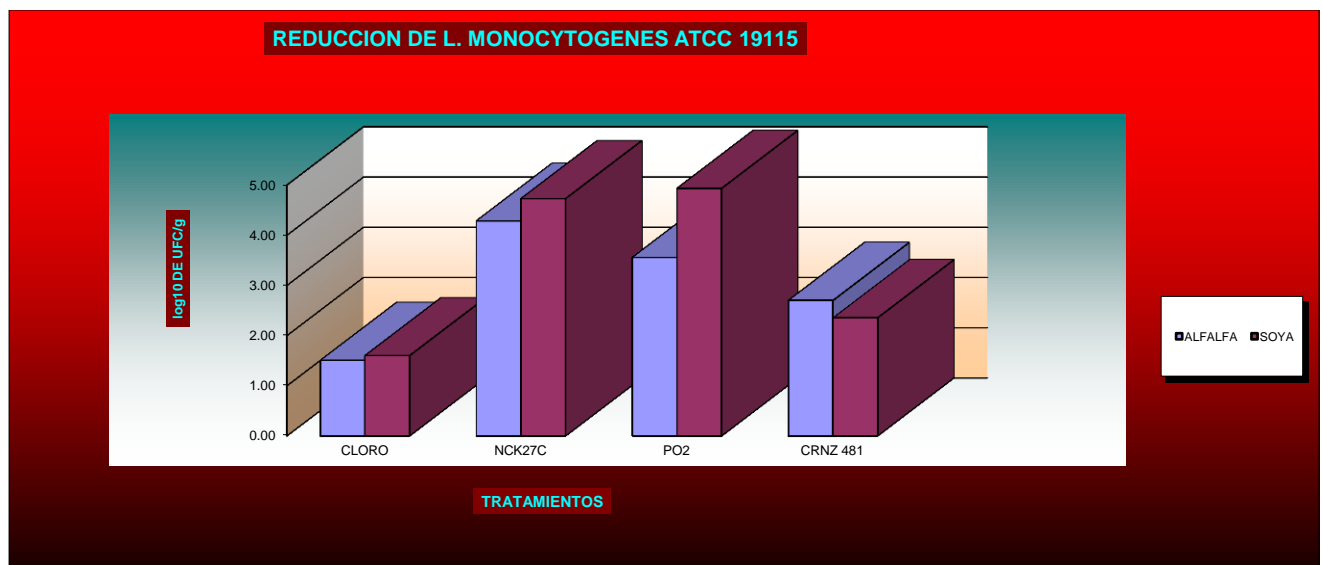
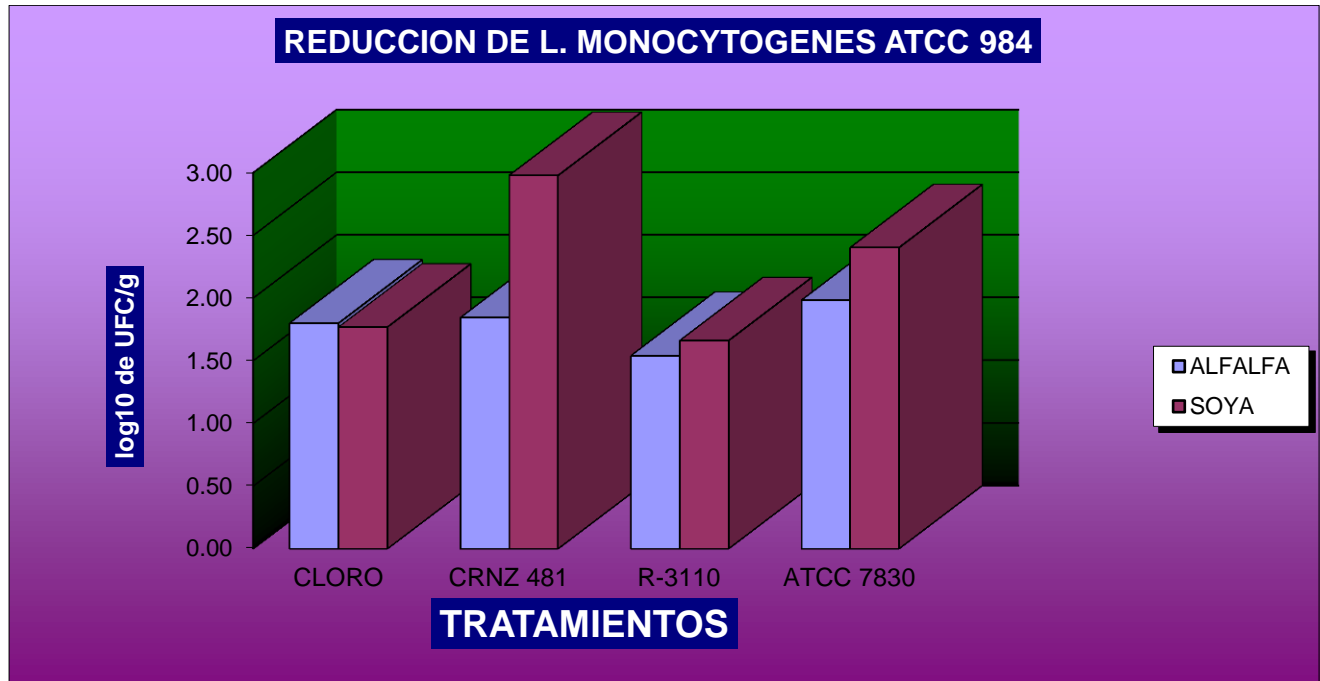


Figura No.10

Inhibición de *Listeria monocytogenes* ATCC 984 por medio de tres diferentes cepas de BAL en semillas de Alfalfa y Soya



### Análisis Estadístico de los Resultados

El análisis estadístico efectuado a los grupos de resultados obtenidos por cepa de bacteria patógena fue el análisis de varianza para determinar si existe una diferencia estadística significativa entre los resultados de cada cepa de BAL y el tratamiento de cloro a 20,000 ppm. Dicho cálculo fue efectuado a cada grupo por cada semilla en lo individual y los resultados se observan en el Tabla No. 14 (Anexo 4).

Al consultar las tablas de valores críticos para los grados de libertad dados por los grupos de datos y un porcentaje de exactitud del 95%, el valor crítico es de 8.85. Todos los valores obtenidos con excepción de uno, sobrepasaron dicho valor, concluyendo que si existe una diferencia significativa entre el tratamiento de cloro y las bacterias de BAL. Algunos de estos valores son extremadamente diferentes, con lo cual se infiere lo que se podría sospechar, con solo observar las tablas de resultados en unidades logarítmicas.

Los valores extremadamente altos en comparación con el valor crítico tales como los obtenidos en:

- *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC 700728 en semilla de alfalfa
- *Escherichia coli* 0157:H7 LUCAM - 95 en semilla de alfalfa

- *Escherichia coli* 0157:H7 LUCAM - 95 en semilla de soya
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 en semilla de alfalfa
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 en semilla de soya

no necesariamente indican que la efectividad del tratamiento es mucho más alta que solo utilizar cloro, sino que la disminución de patógenos en la semilla expresada en u.l., se comportaron de manera muy variable. Esto se debe a que los grados de inhibición entre las cepas de BAL no siempre con similares aún actuando contra el mismo microorganismo.

El único grupo de resultados que no demostró una diferencia de medias significativa fue el grupo de *Listeria monocytogenes* ATCC 984, donde en párrafos anteriores se describió que el comportamiento de la misma no había variado de manera significativa después de usar cepas de BAL posterior al tratamiento con cloro.

Debido a que todos los grupos, con excepción al mencionado en el párrafo anterior, presentó diferencia significativa entre sus tratamientos, es decir, las medias de cada tratamiento no eran similares; y por lo tanto se rechazó la hipótesis nula que enunciaba:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

se procedió a efectuar la prueba de los mínimos cuadrados significativos para determinar si existen grupos de datos dentro del grupo en general, los cuales son estadísticamente similares al hacer dicho análisis tomando en cuenta cada par de promedio.

Todos los promedios de todos los grupos resultaron estadísticamente diferentes del tratamiento con cloro para todos los patógenos, con excepción de *Listeria monocytogenes* ATCC 984 utilizando como cepa de BAL, *Lactococcus lactis* R-3110. En este caso particular el análisis de varianza si arrojó que existen diferencias significativas entre los grupos pero no diferenció a un grupo que en este caso particular era estadísticamente similar. Por lo cual se puede concluir que la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 984 no posee un efecto antagónico por medio de las cepas de BAL en alfalfa y soya.

### **Germinación de las Semillas de Alfalfa y Soya**

Al analizar las Tablas No. 15-17 (Anexo 6-8), se puede observar que ninguna de las semillas de alfalfa y soya tratadas con las cepas de BAL, germinaron en índices aceptables después del tratamiento con cepas de BAL por 24 horas. Este tiempo de embebido fue elegido al azar para asegurar así la completa absorción del sobrenadante bacteriano hacia las estructuras internas de la semilla.

Ninguno de los porcentajes de germinación excedió el 6%, indicando así que la semilla fue dañada en el tratamiento con las bacterias lácticas. En cambio, las semillas tratadas únicamente con cloro a 20,000 ppm por quince minutos, resisten perfectamente dicho tratamiento evidencia porcentajes de germinación alrededor del 90 % casi en todos los casos para ambos tipos de semillas.

Este descenso dramático en la germinación se debe básicamente al pH tan bajo por medio del cual se inactivan muchas enzimas o se desnaturalizan muchos compuestos necesarios en el proceso de germinación de las semillas. Por tal razón dicho procedimiento puede ser utilizado en alimentos no sensibles a estas condiciones o por medio de un tratamiento menos prolongado, con lo cual disminuye el tiempo y tasa de absorción hacia el interior de la semilla, muy importante para la eliminación del patógeno escondido en las partes internas de la estructura de la semilla

A pesar de que para el presente trabajo el poder de inhibición contra las cepas de *Salmonella* sp., *Escherichia coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes* fue altamente efectivo para ambos tipos de semilla, pero interfirió con el proceso de germinación de las mismas, se puede utilizar dicho procedimiento de desinfección en alimentos que no sean afectados de una manera química u organolépticamente significativa por un proceso similar, tal como podría ser el caso de melones, los cuales han sido causantes de brotes reportados en Estados Unidos por contener *Salmonella poona* en su corteza u otros alimentos implicados en intoxicaciones alimentarias en nuestro país.

## X. CONCLUSIONES

- Las cepas de BAL al ser utilizadas como antagonistas contra patógenos en semillas de alfalfa y soya, pueden ser efectivas en controlar las mismas aún en cantidades de  $1 \times 10^8$  UFC/g, después de un tratamiento de cloro a 20,000 ppm. La reducción posible de alcanzar al utilizar dicho tratamiento es 7 unidades logarítmicas
- La inhibición in vitro demostrada por algunas cepas de BAL hacia determinados patógenos, no necesariamente es efectiva in vivo al desinfectar semillas de alfalfa y soya, tal como fue evidenciado por *Listeria monocytogenes* ATCC 984 en semillas de alfalfa al ser tratadas con *Lactococcus lactis* CRNZ 481.
- Al utilizar caldos de cultivo de cepas de BAL para tratar semillas de soya y alfalfa, se produce una ausencia casi total de germinación, lo cual no constituye a este método como adecuado para la desinfección de dichas semillas.
- Esta técnica de eliminación de patógenos por competencia bacteriana podría ser aplicada a una serie de procesos de producción en diversas clases de alimentos, tales como jugos de naranja y otros tipos de alimentos que toleren cargas de bacterias relativamente altas, sin presentar alteraciones organolépticas.
- Las semillas de soya y alfalfa con bacterias patógenas no son seguras para ser sembradas después de un tratamiento con cloro residual a 20,000 ppm, puesto que el nivel de reducción que provee dicho tratamiento oscila alrededor de 1-2 unidades logarítmicas de UFC.
- El análisis de varianza no refleja como tal la totalidad de las diferencias entre los grupos. Para determinar la misma se deben utilizar tratamientos estadísticos posteriores para confirmar dicha observación.

## **XI. RECOMENDACIONES**

- Efectuar estudios en semillas de alfalfa y soya, con pH controlados de caldos de BAL, para evaluar el grado de antagonismo bacteriano a pH neutro.
- Evaluar el método utilizado en este estudio en alimentos que se deseen ser desinfectados y que puedan ser susceptibles a daños por desinfección química, tal como el caso de melones y brócoli.
- Determinar la concentración de peróxido de hidrógeno en el caldo de crecimiento de las cepas de BAL, para evaluar una relación entre la misma y el grado de inhibición in vivo e in vitro.
- Efectuar estudios con el mismo diseño de tratamientos con la única variación en los tiempos de inmersión de la semilla, es decir, sustituir 24 horas por períodos más cortos de 2, 4,8 y 16 horas.
- Realizar trabajos de investigación donde se pueda incluir el procedimiento del presente proyecto en tipos de alimentos tales como los quesos artesanales causales importantes de intoxicaciones a nivel nacional.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- 1) *A multistate Outbreak of Salmonella serotype Kottbus Infections Associated with Eating Alfalfa Sprouts*. Recuperado de Internet el día 6 de Marzo de 2002 de :<http://www.cdc.gov/od/oc/media/mmwrnews/n020111.htm>
- 2) *Alfalfa sprouts*. Recuperado de Internet el día 2 de Marzo de 2002 de: [www.laurushealth.com/library/HealthGuide/CAM/topic.asp.htm](http://www.laurushealth.com/library/HealthGuide/CAM/topic.asp.htm)
- 3) Alfalfa. *Medicago sativa*. Recuperado de Internet el día 4 de marzo de 2002:[www.nutritionabout.com/herbs/alfalfa.html](http://www.nutritionabout.com/herbs/alfalfa.html)
- 4) Balch J. and Balch P. 1997. *Prescription for Nutritional Healing*. Avery Publishing. pages 49,64
- 5) Benkerroum N., H. Oubel and L.B. Mimoun. 2002. *Behavior of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in Yogurt Fermented with a Bacteriocin-Producing Thermophilic Starter*. Journal of Food Protection 65:799 – 805.
- 6) Bruno M., A. Kaiser and T. Montville. 1992. *Depletion of Proton Motive Force by Nisin in Listeria monocytogenes Cells*. Applied and Environmental Microbiology 58: 2255 - 2259.
- 7) Castro-Rosas, J. and E. Escartin. 2000. *Survival and Growth of Vibrio cholerae 01, Salmonellatyphi and Escherichia coli 0157:H7 in Alfalfa Sprouts*. Journal of Food Science, 65: 321-326
- 8) Chin H. 2001. *Detection and Antibacterial Activity of ABacteriocin Produced by Lactobacillus plantarum*. Food Science and Biotechnology 10: 335-341.
- 9) Chung K., J. Dickson and J. Crouse. 1989. *Effects of Nisin on Growth of Bacteria Attached to Meat*. Applied and Environmental Microbiology 55: 1329 - 1333.
- 10) *Current Science Relating to Sprouts and Needed Control Measures*. Recuperado de Internet el día 6 de Marzo de 2002 de : <http://www.cspinet.org/reports/sprouts.html>
- 11) Demirci A., L. Beauchat and W.F. Fett. 2002. *Inactivation of Escherichia coli 0157:H7 on Inoculated Alfalfa Seeds with Ozonated Water and Heat Treatment*. Journal of Food Protection, 65: 447-451
- 12) *E.coli 0157:H7 - Canadian Research Offers Hope Against a Nasty Bug*. Recuperado de Internet el día 6 de Marzo de 2002 de : <http://cbdn.ca/english/discover/coli.html>
- 13) Fan X., and D.W. Thayer. 2001. *Quality of Irradiated Alfalfa Sprouts*. Journal of Food Protection, 64: 1574-1578.
- 14) Feng, P.1997. *A Summary of Background Information and Food borne Illness Associated with the Consumption of Sprouts*. Recuperado de Internet el día 6 de Marzo de 2002 de:<http://vm.cfsn.gov/-mow/sprouts.html>
- 15) Foegeding P. and A. B. Thomas. 1992. *Enhanced Control of Listeria monocytogenes by In Situ- Produced Pediocin during Dry Fermented Sausage Production*. Applied and Environmental Microbiology 58: 884 – 890.
- 16) *Food Poisoning from Alfalfa Sprouts*.1997.MMWR, 46:741-744
- 17) Gandhi M., S. Golding, S. Yaron and K.R. Mathews. 2001. *Use of Green Fluorescent Protein Expressing Salmonella Stanley to Investigate Survival, Spatial Location, and Control on Alfalfa Sprouts*. Journal of Food Protection, 64 : 1891 – 1898.
- 18) Himathongkham, S., S Nuanualsuwan, H. Riemann and D. Oliver. 2001. *Reduction of Escherichia coli 0157:H7 and SalmonellaTyphimurium in Artificially Contaminated*

- Contaminated Alfalfa Seeds and Mung Beans by Fumigation with Ammonia. *Journal of Food Protection*, 64: 1817 – 1819.
- 19) **Holliday, S.A., A.J. Scouten and L.R. Beuchat.** 2001. Efficacy of Chemical Treatments in Eliminating *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Scarified and Polished Alfalfa Seeds. *Journal of Food Protection*, 64: 1496-1495
  - 20) Importance of Alfalfa. Recuperado de Internet el día 6 de Marzo de 2002. [www.usda.gov/nass/pubs/agr98/acro98.htm](http://www.usda.gov/nass/pubs/agr98/acro98.htm)
  - 21) **International Specialty Supply.** 1987. Air Exchange Necessary for Healthy Alfalfa Sprouts. *Sprouting World*, Vol.1 No.4
  - 22) **International Specialty Supply.** 1987. Changing Hard Seed to Quick Seed. *Sprouting World*, Vol.1 No.3
  - 23) **International Specialty Supply.** 1987. Solute Leaking during Imbibitions. *Sprouting World*, Vol.1 No.8
  - 24) **International Specialty Supply.** 1988. Alfalfa Seeding: Density vrs. Yield. *Sprouting World*, Vol.2 No.3
  - 25) **International Specialty Supply.** 1996. Beating the Heat. *Sprouting World*, Vol.7 No.2
  - 26) **International Specialty Supply.** 1996. The Germination Process. *Sprouting World*, Vol.7 No.3
  - 27) **Ivanova I.** 2000. Detection, Purification and Partial Characterization of a Novel Bacteriocin Substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 Isolated from Boza- Bulgarian Traditional Cereal Beverage. *Biocatalysis* 25: 47 – 53.
  - 28) **Jimenez – Diaz R., and J. Ibarra.** 1995. Purification and Partial Amino Acid Sequence of Plantaricin S, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the Activity of Which Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4459 - 4463.
  - 29) **Kanatani K., M. Oshimura and K. Sang.** 1995. Isolation and Characterization of Acidocin A and Cloning of the Bacteriocin Gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1061-1067.
  - 30) **Khalid F., R. Siddiqi and N. Mojgani.** 1999. Detection and Characterization of A Heat Stable Bacteriocin (Lactocin LC-09) Produced by A Clinical Isolate of *Lactobacilli*. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences* 12: 1-4.
  - 31) **Kim C., G. Ji and C. Ahn.** 2000. Purification and Molecular Characterization of a Bacteriocin from *Pediococcus* sp. KCA1303-10 Isolated from Fermented Flatfish. *Food Science and Biotechnology* 9: 270- 276
  - 32) **Lewus C., A. Kaiser and T. Montville.** 1991. Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1683 - 1688.
  - 33) **Lininger, S.** 1998. *The Natural Pharmacy*. Prima Publishing. pages 230-231
  - 34) **Mayr-Harting A., J. Hedges and R. Berkeley.** 1972. Methods for Studying Bacteriocins. *Methods in microbiology* 7: 315- 422.
  - 35) **MMWR.** 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 Infection Associated with Eating Alfalfa Sprouts-Michigan and Virginia, June-July 1997, 46:32-39
  - 36) **Mohle-Boetani, J.** 2001. *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* Infections Associated with Sprouts in California, 1996-1998. *Annals of Internal Medicine*, 135:239- 247

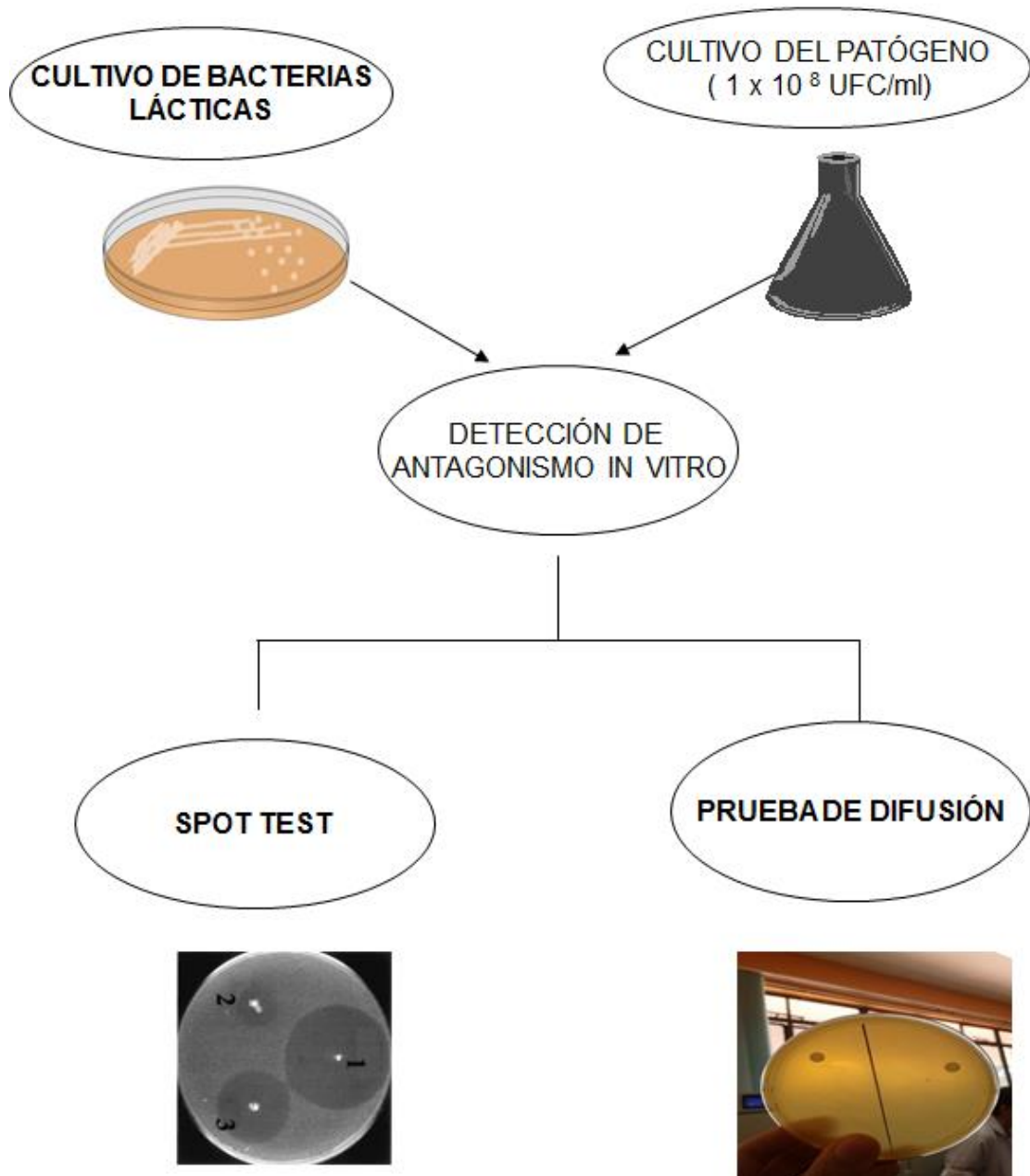
- 37) **Morgan S., P. Ross and C. Hill.** 1995. Bacteriolytic Activity Caused by the Presence of a Novel Lactococcal Plasmid Encoding Lactococcins A, B and M. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2995- 3001.
- 38) **Mortvert C. and J.N Meyer.** 1991. Purification and Amino Acid Secuence of Lactocin S, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1829 - 1834.
- 39) **Nielsen J., J. Dickson and J. Crouse.** 1989. Use of a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici* To Inhibit *Listeria monocytogenes* Associated with Fresh Meat. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2142 - 2145.
- 40) Outbreak of *Salmonella* paratyphivar Java due contaminated Alfalfa Sprouts in Alberta. Recuperado de Internet el día 6 de Marzo de 2002 de : <http://hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-rmtc/01vol27/dr2716ea.html>
- 41) **Piard J. and P.M. Muriana.** 1992. Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine – Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 279 – 284.
- 42) **Rajkowski, K. and D.W. Thayer.** 2001. Alfalfa Seed Germination and Yield Ratio and Alfalfa Sprout Microbial Keeping Quality Following Irradiation of Seeds and Sprouts. *Journal of Food Protection*, 64: 1995-1998.
- 43) Recall of Alfalfa Sprouts. 2001. Recuperado de Internet el día 6 de Marzo de 2002 de : <http://berkeley.ca.us/state/health/advisory.html>
- 44) Safe Tables our Priority. Recuperado de Internet el día 6 de Marzo de 2002 de : <http://stop-usa.org/news/priorcom/nacmcco.html>
- 45) **Schillinger U. and F. Lücke.** 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906
- 46) **Schillinger U., M. Kaya and F. Lücke.** 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin – producing strain of *Lactobacillus sake*. *J of Applied Bacteriology* 70: 473 – 478.
- 47) **Soylemez, G.** 2001. Microbial Quality of Alfalfa Seeds and Sprouts after a Chlorine Treatment and Packaging Modification. *Journal of Food Science*, 66: 34-39
- 48) **Suslow T., W. Jiangchun, W.F. Fett and L. Harris.** 2002. Detection and Elimination of *Salmonella* bandaka from Naturally Contaminated Alfalfa Seed by Treatment with Heat or Calcium Hypochlorite. *Journal of Food Protection* 65: 452 – 458.
- 49) **Tagg J. and A. McGiven.** 1971. Assay System for Bacteriocins. *Applied Microbiology* 21: 943.
- 50) **Tagg J., A. Dajani and L. Wannamaker.** 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews* 40: 722 – 756.
- 51) **Taormina, P., L. Beuchat., and L. Slusker.** 1998. Infections Associated with Eating Seed Sprouts: An International Concern. *Journal of Food Safety*, 5:728-739
- 52) The value of alfalfa. Nutritional composition. Recuperado de Internet el día 2 de Marzo de 2002 de: [www.nutrition.about.com/alfalfa/sprouts.htm](http://www.nutrition.about.com/alfalfa/sprouts.htm)
- 53) The value of Sprouts. Several articles from various sources. Recuperado de Internet el día 2 de Marzo de 2002 de: [www.livingfoods.com/articles/sprouts.html](http://www.livingfoods.com/articles/sprouts.html)
- 54) Three Washington illnesses linked to Oregon salmonella outbreak. Recuperado de Internet el día 6 de Marzo de 2002 de : <http://doh.wa.gov/Publicat/99-17.html>

- 55) **Venema K., and T. Abee.** 1993. Mode of Action of Lactococcin B, a Thiol – Activated Bacteriocin from *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology 59: 1041 - 1048.
- 56) **Waltz L.** Alfalfa: It isn't just for horses any more. Recuperado de Internet el día 2 de marzo de 2002: [www.gardenguides.com/herbs/alfalfa.htm](http://www.gardenguides.com/herbs/alfalfa.htm)
- 57) **Winkowski K., A. Crandall and T. Montville.** 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Lactobacillus bavaricus MN in Beef Systems at Refrigeration Temperatures. Applied and Environmental Microbiology 59: 2552- 2557.
- 58) **Yang R., M. Johnson and B. Ray.** 1992. Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 58: 3355 - 3359.
- 59) **Yousef A.** 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* in Wiener Exudates in the Presence of *Pediococcus acidilactici* H or PediocinACh during Storage at 4 or 25°C. Applied and Environmental Microbiology 57: 1461 - 1467.

## XIV. ANEXOS

Figura No.11 PRUEBA DE DIFUSIÓN

### MARCHA ANALÍTICA



# MARCHA ANALITICA

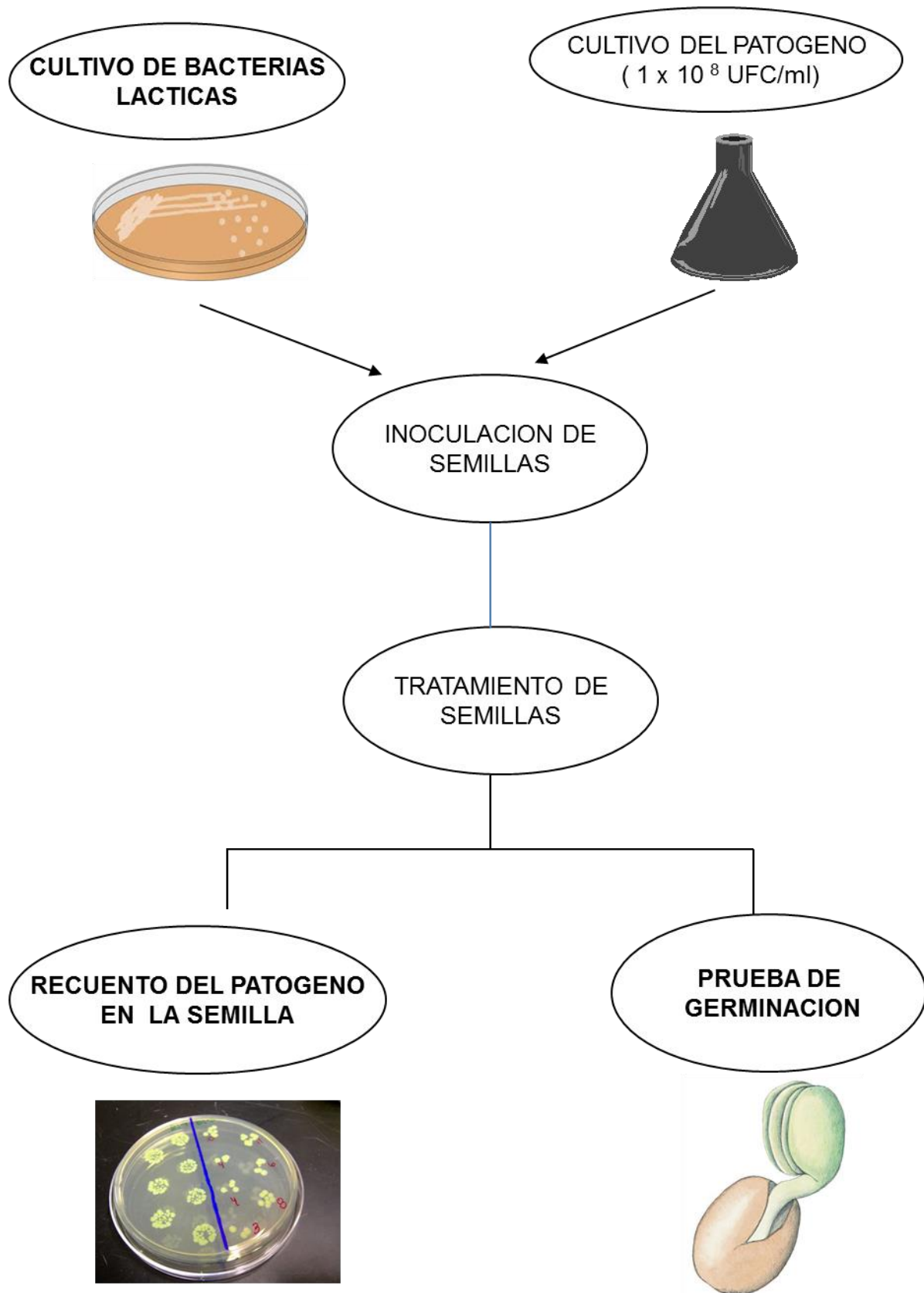


Tabla No.3 Radio de Inhibición de *Salmonella* por medio de la prueba de difusión

	<i>Salmonella arizonae</i> ATCC 13046	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076
<i>Pediococcus acidilacti</i> Pac1	-	-	±
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	-	±	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK 137	-	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2	-	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2k5	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338	±	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ 481	±	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> R-3108	±	±	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> R-3110	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830	-	-	-

(-) = no inhibición; (±) = inhibición parcial con un halo de < 5 mm; (+) = halo de inhibición > 5 mm

Tabla No. 4 Radio de Inhibición de *Salmonella* por medio de Spot Test

	<i>Salmonella arizonae</i> ATCC 13046	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076
<i>Pediococcus acidilacti</i> Pac1	-	-	±
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	-	±	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK 137	-	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2	-	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2k5	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ 481	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	±	±	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	±	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	-	±	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	±	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830	-	-	-

(-) = no inhibición; (±) = inhibición parcial con un halo de < 5 mm; (+) = halo de inhibición > 5 mm

Tabla No.5 Radio de Inhibición de *Escherichia coli* 0157:H7 por medio de la prueba de Difusión

	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 35150	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 700728	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 LUCAM-95
<i>Pediococcus acidilacti</i> Pac1	+	±	±
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	+	±	±
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK 137	±	±	±
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2	±	+	±
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2k5	+	+	±
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338	±	+	±
<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ 481	±	-	±
<i>Lactococcus lactis</i> R-3108	±	-	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	±	-	±
<i>Lactococcus lactis</i> R-3110	±	-	±
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	±	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830	±	±	-

(-) = no inhibición; (±) = inhibición parcial con un halo de < 5 mm; (+) = halo de inhibición > 5 mm

Tabla No. 6 Radio de Inhibición de *Escherichia coli* 0157:H7 por medio de Spot Test

	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 35150	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 700728	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 LUCAM-95
<i>Pediococcus acidilacti</i> Pac1	-	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	-	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK 137	-	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2	-	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2k5	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338	+	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ 481	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> R-3108	±	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> R-3110	±	±	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	±	±	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830	-	-	-

(-) = no inhibición; (±) = inhibición parcial con un halo de < 5 mm; (+) = halo de inhibición > 5 mm

Tabla No. 7

Radio de Inhibición de *Listeria monocytogenes* por medio de la prueba de difusión

	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 984
<i>Pediococcus acidilacti</i> Pac1	±	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	+	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK 137	±	±
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2	+	±
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2k5	-	+
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338	±	±
<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ 481	++	±
<i>Lactococcus lactis</i> R-3108	±	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	±	±
<i>Lactococcus lactis</i> R-3110	±	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	+	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830	+	±

(-) = no inhibición; (±) = inhibición parcial con un halo de &lt; 5 mm; (+) = halo de inhibición &gt; 5 mm

Tabla No. 8

Radio de Inhibición de *Listeria monocytogenes* por medio de Spot Test

	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 984
<i>Pediococcus acidilacti</i> Pac1	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK 137	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2	-	-
<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2k5	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ 481	±	++
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	±	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830	-	-

(-) = no inhibición; (±) = inhibición parcial con un halo de &lt; 5 mm; (+) = halo de inhibición &gt; 5 mm

Tabla No.9

Cepas seleccionadas para inhibir a cada patógeno en particular

	<b>CEPA 1</b>	<b>CEPA 2</b>	<b>CEPA 3</b>
<i>Salmonella arizonae</i> ATCC 13046	<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ 481	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK137	<i>Lactococcus lactis</i> R-3108
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	<i>Pediococcus acidilacti</i> Pac1	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 35150	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338	<i>Lactococcus lactis</i> R-3110	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 700728	<i>Lactococcus lactis</i> R-3110	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 LUCAM-95	<i>Lactococcus lactis</i> R-3108	<i>Lactococcus lactis</i> R-3110	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2	<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ 481
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 984	<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ 481	<i>Lactococcus lactis</i> R-3110	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830

### Anexo No. 3

Tabla No.10

Concentración de patógenos en los inóculos y recuento de los mismos en las semillas de Alfalfa y Soya

	<b>RECuento EN INOCULO</b>	<b>ALFALFA</b>	<b>SOYA</b>
<b><i>Salmonella arizonae</i> ATCC 13046</b>	2.3 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	2.9 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1.1 x 10 <sup>5</sup> UFC/g
<b><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028</b>	2.6 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	4.3 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1.2 x 10 <sup>6</sup> UFC/g
<b><i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076</b>	3.2 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	4.5 x 10 <sup>5</sup> UFC/g	9.8 x 10 <sup>5</sup> UFC/g
<b><i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 35150</b>	4.1 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	2.6 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1 x 10 <sup>6</sup> UFC/g
<b><i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 700728</b>	2.2 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	1.3 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1.1 x 10 <sup>6</sup> UFC/g
<b><i>Escherichia coli</i> 0157:H7 LUCAM-95</b>	1.9 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	1.5 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	8.7 x 10 <sup>5</sup> UFC/g
<b><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115</b>	3.1 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	2.8 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1.9 x 10 <sup>6</sup> UFC/g
<b><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 984</b>	2.7 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	3.4 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	2.4 x 10 <sup>6</sup> UFC/g

## Anexo No. 4

Tabla No. 11

Análisis de Variancia de los tratamientos específicos para cada cepa de patógeno

<b>CEPAS</b>	<b>SEMILLA</b>	<b>VALOR ANDEVA</b>
<i>Salmonella arizonae</i> ATCC 13046	<b>ALFALFA</b>	P > 0.05
<i>Salmonella arizonae</i> ATCC 13046	<b>SOYA</b>	P > 0.05
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<b>ALFALFA</b>	P > 0.05
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<b>SOYA</b>	P > 0.05
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	<b>ALFALFA</b>	P > 0.05
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	<b>SOYA</b>	P > 0.05
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 35150	<b>ALFALFA</b>	P > 0.05
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 35150	<b>SOYA</b>	P > 0.05
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 700728	<b>ALFALFA</b>	P > 0.05
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 700728	<b>SOYA</b>	P > 0.05
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 LUCAM-95	<b>ALFALFA</b>	P > 0.05
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 LUCAM-95	<b>SOYA</b>	P > 0.05
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<b>ALFALFA</b>	P > 0.05
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<b>SOYA</b>	P > 0.05
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 984	<b>ALFALFA</b>	<b>P &lt; 0.05</b>
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<b>SOYA</b>	P > 0.05

VALOR CRITICO: 8.85 con un nivel de confianza del 95 %

## Anexo No.5

Tabla No.12

Porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa y soya contaminadas con *Salmonella sp.* después de sus respectivos tratamientos

### SALMONELLA ARIZONAE ATCC 13046

SEMILLA TRATADA CON CLORO 20000 ppm	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
<b>ALFALFA</b> 90	2	1	0
<b>SOYA</b> 95	1	3	2

### SALMONELLA TIPHYMURIUM ATCC 14028

SEMILLA TRATADA CON CLORO 20000 ppm	<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<b>ALFALFA</b> 95	0	2	3
<b>SOYA</b> 99	1	1	0

### SALMONELLA ENTERITIDIS ATCC 13076

SEMILLA TRATADA CON CLORO 20000 ppm	<i>Pediococcus acidilacti</i> Pac1	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469
<b>ALFALFA</b> 86	1	0	2
<b>SOYA</b> 90	1	2	2

## Anexo No. 6

Tabla No. 13

Porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa y soya contaminadas con *Escherichia coli* 0157:H7 después de sus respectivos tratamientos

### ESCHERICHIA COLI 0157:H7 ATCC 35150

SEMILLA TRATADA CON CLORO 20000 ppm	<i>Pediococcus acidilacti</i> Pac1	<i>Pediococcus acidilacti</i> NCK27C	<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2k5
<b>ALFALFA</b>			
88	2	1	2
<b>SOYA</b>			
94	1	2	3

### ESCHERICHIA COLI 0157:H7 ATCC 700728

SEMILLA TRATADA CON CLORO 20000 ppm	<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2	<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2k5	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 9338
<b>ALFALFA</b>			
83	2	4	4
<b>SOYA</b>			
90	4	3	2

### ESCHERICHIA COLI 0157:H7 LUCAM-95

SEMILLA TRATADA CON CLORO 20000 ppm	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> ATCC 8014
<b>ALFALFA</b>			
88	2	3	1
<b>SOYA</b>			
92	2	5	4

## Anexo No. 7

Tabla No. 14

Porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa y soya contaminadas con *Listeria monocytogenes* después de sus respectivos tratamientos

<b>LISTERIA MONOCYTOGENES ATCC 19115</b>			
<b>SEMILLA TRATADA CON CLORO 20000 ppm</b>	<i>Pediococcus acidilacti</i> <b>NCK27C</b>	<i>Pediococcus acidilacti</i> PO2	<i>Lactococcus lactis</i> CRNZ <b>481</b>
<b>ALFALFA</b>			
88	1	0	1
<b>SOYA</b>			
92	5	6	2
<b>LISTERIA MONOCYTOGENES ATCC 984</b>			
<b>SEMILLA TRATADA CON CLORO 20000 ppm</b>	<i>Lactococcus lactis</i> <b>CRNZ 481</b>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> ATCC 8014
<b>ALFALFA</b>			
82	1	1	7
<b>SOYA</b>			
95	3	6	.4